



ImmunoSmol

Small molecule antibodies for research, diagnostics & therapy

ImmunoSmol SAS
229 cours de l'argonne
33000 Bordeaux - France
+33 (0)5 6431 1170
contact@immuSmol.com
www.immuSmol.com

Instructions for use

Kynurenine ELISA

REF

BA E-2200



IVD



1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of L-Kynurenine in serum and plasma samples. After acylation Kynurenine is quantitatively determined by ELISA.

The competitive ELISA uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The acylated standards, controls and samples and the solid phase bound analyte compete for a fixed number of antibody binding sites. When the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antibody complexes are removed by washing. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate. The reaction is monitored at 450 nm. Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standards.

1.2 Clinical application

Kynurenine is a non-proteinogenic amino acid that is produced as a metabolic intermediate during the degradation of tryptophan. The degradation of tryptophan is catalyzed by the inducible enzyme indolamine-2,3-dioxygenase (IDO). The product is kynurenine. Cytokines, in particular interferon- γ , influence the activity of the IDO, so that's why the kynurenine path is closely linked to the immune system. Kynurenine can be further converted to neuroprotective kynurenic acid, but also to neurotoxic quinolinic acid. Disorders of the tryptophan kynurenine metabolism are associated with different disease patterns, such as stress, cancer, and depression. The latter can be treated by tryptophan administration. This requires a determination of the kynurenine to tryptophan ratio, which is a reliable marker for the IDO activity. If no increased IDO activity is detected, the administered tryptophan can serve as the starting product for serotonin synthesis.

2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations

2.1 Procedural cautions, guidelines and warnings

- (1) This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and has to be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for a certain type of sample as indicated in *Intended Use* (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (6) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (7) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided.
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (9) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.
- (10) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (11) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (12) A standard curve must be established for each run.
- (13) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report.
- (14) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (15) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (16) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them.
- (17) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.

- (18) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (19) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
- (20) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

2.2 Limitations

Any inappropriate handling of samples or modification of this test might influence the results.

2.2.1 Interfering substances

Serum/Plasma

Samples containing precipitates or fibrin strands might cause inaccurate results. Hemolytic samples (up to 4 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 50 mg/dl bilirubin) and lipemic samples (up to 1700 mg/dl triglycerides) have no influence on the assay results.

2.2.2 Drug interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of kynurenine level in the sample.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

Store the unopened reagents at 2 - 8 °C until expiration date. Do not use components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened the reagents are stable for 1 month when stored at 2 - 8 °C. Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly with desiccant again.

4. Materials

4.1 Content of the kit

BA D-0032  **Microtiter Plate** - Ready to use

Content: 1 x 96 well plate, empty

BA D-0090  **Adhesive Foil** - Ready to use

Content: Adhesive Foils in a resealable pouch

Volume: 1 x 4 foils

BA E-0030  **Wash Buffer Concentrate** - Concentrated 50x

Content: Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH

Volume: 1 x 20 ml/vial, light purple cap

BA E-0040  **Enzyme Conjugate** - Ready to use

Content: Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase

Volume: 1 x 12 ml/vial, red cap

BA E-0055  **Substrate** - Ready to use

Content: Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide

Volume: 1 x 12 ml/vial, black cap

BA E-0080  **Stop Solution** - Ready to use

Content: 0.25 M sulfuric acid

Volume: 1 x 12 ml/vial, light grey cap

Hazards

identification:



H290 May be corrosive to metals.

BA E-2231 KYN **Kynurenine Microtiter Strips** - Ready to use
 Content: 1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant

BA E-2210 AS KYN **Kynurenine Antiserum** - Ready to use
 Content: Rabbit anti-kynurenine antibody, blue coloured
 Volume: 1 x 6 ml/vial, blue cap

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration ng/ml	Concentration nmol/l	Volume/Vial
BA E-2201	STANDARD A	white	0	0	4 ml
BA E-2202	STANDARD B	light yellow	100	480	4 ml
BA E-2203	STANDARD C	orange	300	1 440	4 ml
BA E-2204	STANDARD D	dark blue	1 000	4 800	4 ml
BA E-2205	STANDARD E	light grey	3 000	14 400	4 ml
BA E-2206	STANDARD F	black	10 000	48 000	4 ml
BA E-2251	CONTROL 1	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!		4 ml
BA E-2252	CONTROL 2	dark red			4 ml

Conversion: Kynurenine (ng/ml) x 4.80 = Kynurenine (nmol/l)

Content: TRIS buffer with non-mercury stabilizer, spiked with defined quantity of kynurenine

BA E-2211 ACYL-BUFF **Acylation Buffer** - Ready to use
 Content: 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer
 Volume: 1 x 30 ml/vial, brown cap

BA E-2212 ACYL-REAG **Acylation Reagent** - Ready to use
 Content: acylation reagent in dimethylsulfoxide (DMSO)
 Volume: 1 x 3 ml/vial, green cap

4.2 Additional materials and equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 20 – 500 µl
- Microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 – 650 nm
- Temperature controlled incubator (37 °C) or similar heating device
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Vortex mixer

5. Sample collection and storage

Plasma

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing EDTA as anti-coagulant (Monovette™ or Vacuette™) and centrifuged according to manufacturer's instructions immediately after collection.

Haemolytic, icteric and lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: up to 48 hours at 2 - 8 °C, for longer period (up to 6 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

Serum

Collect blood by venipuncture (Monovette™ or Vacuette™ for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation according to manufacturer's instructions. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Haemolytic, icteric and lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: up to 48 hours at 2 - 8 °C, for longer period (up to 6 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

6. Test procedure

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Duplicate determinations are recommended. It is recommended to number the strips of the microwell plate before usage to avoid any mix-up.

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent, and the absorption values may vary if a thermostat is not used. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. Varying incubation times will have similar influences on the absorbance. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20 – 25 °C.

6.1 Preparation of reagents

Wash Buffer

Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate with water (deionized, distilled, or ultra-pure) to a final volume of 1000 ml.

Storage: 1 month 2 – 8 °C.

Acylation Reagent

The Acylation Reagent has a freezing point of 18.5 °C. To ensure that the Acylation Reagent forms a homogeneous, crystal-free solution when being used, it must have reached room temperature.

Kynurenine Microtiter Strips

In rare cases residues of the blocking and stabilizing reagent can be seen in the wells as small, white dots or lines. These residues do not influence the quality of the product.

6.2 Acylation

1.	Pipette 10 µl of the standards, controls and samples into the appropriate wells of the Microtiter Plate .
2.	Add 250 µl of the Acylation Buffer to all wells.
3.	Add 25 µl of the Acylation Reagent to all wells and mix shortly.
4.	Cover the plate with Adhesive Foil and incubate 90 min at 37 °C .
5.	Use 20 µl for the ELISA!

6.3 Kynurenine ELISA

1.	Pipette 20 µl of the prepared standards, controls and samples into the appropriate wells of the Kynurenine Microtiter Strips .
2.	Pipette 50 µl of the Kynurenine Antiserum into all wells and mix shortly.
3.	Cover plate with Adhesive Foil and incubate for 15 - 20 h (overnight) at 2 – 8 °C .
4.	Remove the foil. Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 x by adding 300 µl of Wash Buffer, discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
5.	Pipette 100 µl of the Enzyme Conjugate into all wells.
6.	Incubate for 30 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
7.	Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 x by adding 300 µl of Wash Buffer, discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Pipette 100 µl of the Substrate into all wells and incubate for 20 - 30 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Avoid exposure to direct sunlight!
9.	Add 100 µl of the Stop Solution to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
10.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 450 nm (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

7. Calculation of results

Measuring range	Kynurenine
	63.3 – 10 000 ng/ml

The standard curve is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis).

Use non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).



This assay is a competitive assay. This means: the OD-values are decreasing with increasing concentrations of the analyte. OD-values found below the standard curve correspond to high concentrations of the analyte in the sample and have to be reported as being positive.

The concentrations of the samples and controls can be read directly from the standard curve.

Conversion

$\text{Kynurenine (ng/ml)} \times 4.80 = \text{Kynurenine (nmol/l)}$

Expected reference values

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference value.

Plasma / Serum
237.4 – 754.2 ng/ml

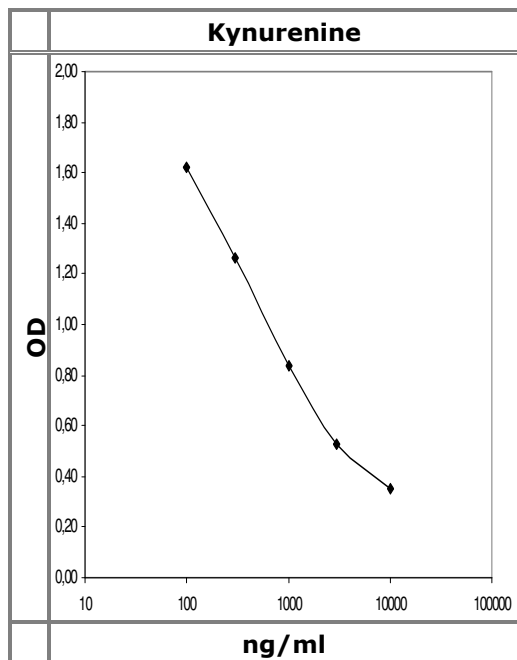
7.1 Quality control

The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC-Report.

7.2 Typical standard curve



Example, do not use for calculation!



8. Assay characteristics

Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	Kynurenine
	45.7 ng/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)
	L-Kynurenine	100
	5-Hydroxy-DL-Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Serotonin, L-Asparagin, Kynurenic Acid	0.05
	Tryptophan	0.25
	3-Hydroxy-DL-Kynurenin	0.36

Precision Serum							
Intra-Assay				Inter-Assay			
Sample	(ng/ml)	SD	CV (%)	Sample	(ng/ml)	SD	CV (%)
1 (n = 20)	382.3	49.4	12.9	1 (n = 20)	373.8	65	17.5
2 (n = 20)	963.0	99.3	10.3	2 (n = 20)	893.5	119	13.3
3 (n = 20)	2242.0	244.8	10.9	3 (n = 20)	2050.6	295	14.4

Precision Plasma							
Intra-Assay				Inter-Assay			
Sample	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)	Sample	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)
1 (n = 20)	386.5	57.1	14.8	1 (n = 20)	353.7	43	12.3
2 (n = 20)	986.9	90.4	9.2	2 (n = 20)	870.1	62	7.1
3 (n = 20)	2383.8	278.4	11.7	3 (n = 20)	1918.1	164	8.5

Linearity		Range Linearity %	Mean Linearity %	Serial dilution up to
	Serum	90 - 104	95	1:128
	Plasma	89 - 102	94	1:128

Recovery	Serum	Range Recovery (%)	Mean Recovery (%)	% Recovery after spiking
	Sample 1	90 - 109	101	
	Sample 2	90 - 96	93	
	Sample 3	95 - 118	109	
	Plasma	Range Recovery (%)	Mean Recovery (%)	% Recovery after spiking
	Sample 1	82 - 106	96	
	Sample 2	90 - 104	99	
	Sample 3	97 - 110	103	







Method Comparison: ELISA vs. LC-MS/MS	Plasma	LC-MS/MS = 0.9x + 71.5	R ² = 0.9355; N = 30

9. References/Literature

- (1) Lapin et al. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet*, 1(7586):132-6 (1969)
- (2) Milton et al. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.*, 5(11): 2516-22 (1991)
- (3) Oxenkrug et al. Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder: the serotonin hypothesis revisited 40 years later. *Isr J Psychiatry Relat Sci.*, 47(1): 56-63 (2010)
- (4) W.H. de Jong et al. Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., B* 877: 603-609 (2009)

⚠ **For updated literature or any other information please contact your local supplier.**

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	LOT	Batch code	IVD	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE labelled
	Caution	REF	Catalogue number		

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von L-Kynurenin in Serum- und Plasmaproben.

Nach der Azylierung wird Kynurenin quantitativ mit einem kompetitiven ELISA, welcher auf dem Mikrotiterplattenformat basiert, bestimmt. Das Antigen ist an die feste Phase der Mikrotiterplatte gebunden. Die azylierten Standards, Kontrollen und Proben und die an der festen Phase gebundenen Analyten, konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Wenn das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörper-Komplexe durch Waschen entfernt. Der an der festen Phase gebundene Antikörper wird mit einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen Antikörper bestimmt und mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen.

Die Quantifizierung der unbekanntenen Proben erfolgt durch Abgleich der Absorptionen mit einer Referenzkurve, dessen Standardkonzentrationen bekannt sind.

1.2 Klinische Anwendung

Kynurenin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die als Stoffwechselintermediat während der Degradation von Tryptophan entsteht. Die Degradation von Tryptophan wird von dem induzierbaren Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) katalysiert und als Produkt Kynurenin gebildet. Cytokine, insbesondere Interferon- γ , beeinflussen die Aktivität der IDO, sodass der Kynureninpfad eng an das Immunsystem gekoppelt ist. Kynurenin kann weiter zur neuroprotektiven Kynureninsäure, aber auch zur neurotoxischen Quinolinsäure umgewandelt werden.

Störungen des Tryptophan-Kynurenin Metabolismus werden mit unterschiedlichen Krankheitsbildern, z. B. Stress, Krebs sowie depressiver Formenkreis assoziiert. Letzteres Krankheitsbild, der depressive Formenkreis, lässt sich durch eine Tryptophan-Verabreichung therapieren. Hierzu notwendig ist die Bestimmung des Kynurenin zu Tryptophan Verhältnisses, welches ein zuverlässiger Marker für die IDO-Aktivität ist. Wird keine erhöhte IDO-Aktivität nachgewiesen, kann das verabreichte Tryptophan als Ausgangsprodukt zur Serotonin-Synthese dienen.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

- (1) Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter *Verwendungszweck* (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (4) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (6) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.
- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über abbrechbare Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
- (8) Es ist sehr empfehlenswert eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (9) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (10) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Vertiefungen sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (11) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (12) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (13) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen können dem QC-Bericht entnommen werden, der dem Kit beiliegt.

- (14) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (15) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (16) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (17) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe die Sicherheitsdatenblätter (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (18) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (19) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.
- (20) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

2.2 Grenzen des Tests

Jede unsachgemäße Behandlung der Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

2.2.1 Interferenzen

Serum/Plasma

Proben, die ein Präzipitat oder die Fibrinfäden enthalten können zu ungenauen Ergebnissen führen. Hämolytische Proben (bis zu 4 mg/ml Hämoglobin), ikterische Proben (bis 50 mg/dl Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 1700 mg/dl Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des Kynurenin-Gehaltes in der Probe beeinflusst.

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt






Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufzubewahren. Die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 1 Monat stabil, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Beutel der Mikrotiterplatte sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA D-0032	 96	Microtiter Plate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well Platte, leer	
BA D-0090	 FOILS	Adhesive Foil - Gebrauchsfertig
Inhalt:	4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Volumen:	1 x 4 Folien	
BA E-0030	 WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate - 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila	
BA E-0040	 CONJUGATE	Enzyme Conjugate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege Anti-Kaninchen Immunglobuline konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel rot	
BA E-0055	 SUBSTRATE	Substrate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel schwarz	

BA E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 0,25 M Schwefelsäure
 Volumen: 1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel hellgrau
 Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

BA E-2231 **KYN** **Kynurenine Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem widerverschließbaren Beutel

BA E-2210 **AS KYN** **Kynurenine Antiserum** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Kaninchen Anti- Kynurenin Antikörper, blau gefärbt
 Volumen: 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau

Standards und **Controls** - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration ng/ml	Konzentration nmol/l	Volumen/ Fläschchen
BA E-2201	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA E-2202	STANDARD B	hellgelb	100	480	4 ml
BA E-2203	STANDARD C	orange	300	1440	4 ml
BA E-2204	STANDARD D	dunkelblau	1000	4800	4 ml
BA E-2205	STANDARD E	hellgrau	3000	14400	4 ml
BA E-2206	STANDARD F	schwarz	10000	48000	4 ml
BA E-2251	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben		4 ml
BA E-2252	CONTROL 2	dunkelrot			4 ml

Umrechnung: Kynurenin (ng/ml) x 4,80 = Kynurenin (nmol/l)

Inhalt: TRIS Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel, aufgestockt mit einer definierten Menge Kynurenin

BA E-2211 **ACYL-BUFF** **Acylation Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) Puffer
 Volumen: 1 x 30 ml/ Fläschchen, Deckel braun

BA E-2212 **ACYL-REAG** **Acylation Reagent** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Azylierungsmittel in Dimethylsulfoxid (DMSO)
 Volumen: 1 x 3 ml/Fläschchen, Deckel grün

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 20 – 500 µl
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 - 650 nm-Filter
- Wärmeschrank (37 °C) oder ähnliche Heizvorrichtung
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Vortex-Mischer
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

5. Probenmaterial und Lagerung**Plasma**

Das durch Venenpunktion entnommene Vollblut in einem für EDTA-Plasma vorgesehenen Blutentnahmeröhrchen (Monovette oder Vacuette) sammeln und das Plasma direkt nach Angaben des Herstellers zentrifugieren.

Hämolytische, ikterische und lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: bis zu 48 Stunden bei 2 - 8 °C, für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C
 Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Serum

Blut durch Venenpunktion entnehmen (mit Monovette oder Vacuette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation nach Angabe des Herstellers abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Hämolytische, ikterische und lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: bis zu 48 Stunden bei 2 - 8 °C, für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen. Um eventuelle Verwechslungen der Mikrotiterstreifen zu vermeiden, wird empfohlen, diese vor Verwendung zu nummerieren.

Die Reaktion des Antikörpers, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig und sollten durch ein Thermostat sichergestellt sein. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassay ist zwischen 20 - 25 °C.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC 50X** mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 1 Monat bei 2 - 8 °C

Azylierungsreagenz **ACYL-REAG**

Das **ACYL-REAG** hat einen Gefrierpunkt von 18,5 °C. Damit das Azylierungsreagenz bei Gebrauch homogene, kristallfreie Lösung bildet, muss sichergestellt sein, dass es vor der Verwendung Raumtemperatur angenommen hat.

Kynurenin Microtiter Strips

Vereinzelt können Rückstände der Blockier- und Stabilisierlösung in den Wells zu sehen sein (kleine weiße Punkt oder Linien). Diese stellen keine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes dar.

6.2 Azylierung

1. Jeweils 10 µl der Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten der W 96 pipettieren.
2. Jeweils 250 µl ACYL-BUFF in alle Kavitäten pipettieren.
3. Jeweils 25 µl ACYL-REAG in alle Kavitäten pipettieren und kurz schütteln.
4. Platte mit FOIL abdecken und für 90 Minuten bei 37 °C inkubieren.
5. Jeweils 20 µl für den ELISA verwenden!

6.3 Kynurenin ELISA


1. 20 µl der vorbereiteten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten der W KYN pipettieren.
2. 50 µl AS KYN in alle Kavitäten hinzugeben und kurz schütteln.
3. Platte mit FOIL abdecken und für 15 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 - 8 °C inkubieren.
4. FOIL entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 4 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5. 100 µl CONJUGATE in alle Kavitäten pipettieren.
6. Für 30 Min bei RT (20 - 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
7. Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 4 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8. 100 µl SUBSTRATE in alle Kavitäten pipettieren und für 20 - 30 Min bei RT (20 - 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden!
9. 100 µl der STOP-SOLN in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
10. Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm (falls vorhanden gegen eine Referenzwellenlänge von 620-650 nm) innerhalb von 10 Minuten messen

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Kynurenin
	63,3 – 10000 ng/ml

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntenen Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Extinktionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) erstellt.

Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) verwendet.

 *Dieser Assay ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die OD-Werte mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. OD Signale, die unterhalb der Standardkurve liegen, entsprechen einer sehr hohen Konzentration des Analyten in der gemessenen Probe und müssen als positiv gewertet werden.*

Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Umrechnung

Kynurenin (ng/ml) x 4,80 = Kynurenin (nmol/l)

Erwartete Referenzwerte


Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzwert ermittelt.

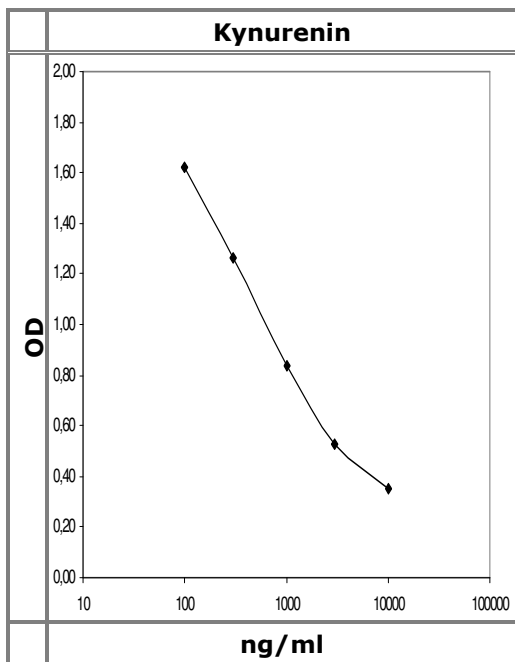
Plasma / Serum
237,4 – 754,2 ng/ml

7.1 Qualitätskontrolle

Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

7.2 Typische Standardkurve

 *Beispiel: bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



8. Testcharakteristika

Analytische Sensitivität (Limit of Detection)	Kynurenin
	45,7 ng/ml

Analytische Spezifität (Cross Reactivity)	Substanz	Kreuzreaktion (%)
	L-Kynurenin	100
	5-Hydroxy-DL-Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Serotonin, L-Asparagin, Kynurensäure	0,05
	Tryptophan	0,25
	3-Hydroxy-DL-Kynurenin	0,36

Präzision Serum							
Intra-Assay				Inter-Assay			
Probe	Mittelwert (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)	Probe	Mittelwert (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)
1 (n = 20)	382,3	49,4	12,9	1 (n = 20)	373,8	65	17,5
2 (n = 20)	963,0	99,3	10,3	2 (n = 20)	893,5	119	13,3
3 (n = 20)	2242,0	244,8	10,9	3 (n = 20)	2050,6	295	14,4

Präzision Plasma							
Intra-Assay				Inter-Assay			
Probe	Mittelwert (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)	Probe	Mittelwert (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)
1 (n = 20)	386,5	57,1	14,8	1 (n = 20)	353,7	43	12,3
2 (n = 20)	986,9	90,4	9,2	2 (n = 20)	870,1	62	7,1
3 (n = 20)	2383,8	278,4	11,7	3 (n = 20)	1918,1	164	8,5

Linearität		Bereich Linearität %	MW Linearität %	Serielle Verdünnung bis zu:
	Serum	90 - 104	95	1:128
	Plasma	89 - 102	94	1:128

Wiederfindung	Serum	Bereich (%)	Mittelwert (%)	% Wiederfindung nach Aufstockung
	Probe 1	90 - 109	101	
	Probe 2	90 - 96	93	
	Probe 3	95 - 118	109	
	Plasma	Bereich (%)	Mittelwert (%)	% Wiederfindung nach Aufstockung
	Probe 1	82 - 106	96	
	Probe 2	90 - 104	99	
	Probe 3	97 - 110	103	







Methodenvergleich: ELISA vs. LC-MS/MS	Plasma	LC-MS/MS = 0,9x + 71,5	R ² = 0,9355; N = 30

9. Referenzen/Literatur

- (1) Lapin et al. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. Lancet, 1(7586):132-6 (1969)
- (2) Milton et al. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. FASEB J., 5(11): 2516-22 (1991)
- (3) Oxenkrug et al. Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder: the serotonin hypothesis revisited 40 years later. Isr J Psychiatry Relat Sci., 47(1): 56-63 (2010)
- (4) W.H. de Jong et al. Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr., B 877: 603-609 (2009)

⚠ **Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anforderung von Ihrem Anbieter gerne zu Verfügung gestellt.**

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer		