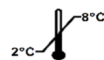




Instructions for use / Gebrauchsanweisung
Tryptophan ELISA

REF

BA E-2700



IVD



Table of contents

1.	Introduction	4
1.1	Intended use and principle of the test	4
1.2	Clinical application	4
2.	Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations	4
2.1	Procedural cautions, guidelines and warnings	4
2.2	Limitations	5
2.2.1	Interfering substances and proper handling of specimens	5
2.2.2	Drug and food interferences	5
2.2.3	High-Dose-Hook effect	5
3.	Storage and stability	5
4.	Materials	5
4.1	Contents of the kit	5
4.2	Calibration and Controls	7
4.3	Additional materials required but not provided in the kit	8
4.4	Additional equipment required but not provided in the kit	8
5.	Sample collection, handling and storage	8
6.	Test procedure	8
6.1	Preparation of reagents and further notes	8
6.2	Preparation of samples – Precipitation	9
6.3	Derivatization	9
6.4	Tryptophan ELISA	9
7.	Calculation of results	9
7.1	Expected reference value	10
7.2	Typical standard curve	10
8.	Control samples	10
9.	Assay characteristics	11
9.1	Performance data	11
9.2	Metrological Traceability	12
10.	References/Literature	12
11.	Changes	13

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	14
1.1	Verwendungszweck und Testprinzip	14
1.2	Klinische Anwendung	14
2.	Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen	14
2.1	Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen	14
2.2	Grenzen des Tests	15
2.2.1	Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben	15
2.2.2	Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel	15
2.2.3	High-Dose-Hook Effekt	15
3.	Lagerung und Haltbarkeit	15
4.	Materialien	16
4.1	Reagenzien im Kit	16
4.2	Kalibratoren und Kontrollen	18
4.3	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien	18
4.4	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte	18
5.	Probensammlung, -behandlung und -lagerung	18
6.	Testdurchführung	19
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise	19
6.2	Probenvorbereitung – Präzipitation	19
6.3	Derivatisierung	19
6.4	Tryptophan ELISA	20
7.	Berechnung der Ergebnisse	20
7.1	Erwartete Referenzbereiche	20
7.2	Typische Standardkurve	21
8.	Kontrollproben	21
9.	Assaycharakteristika	21
9.1	Leistungsdaten	21
9.2	Metrologische Rückführbarkeit	22
10.	Referenzen/Literatur	22
11.	Änderungen	23

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of L-tryptophan in urine, serum and EDTA-plasma samples for the determination of tryptophan homeostasis.

Tryptophan is present in the blood in protein-bound form. To isolate tryptophan, protein precipitation is first performed followed by a derivatization process. The subsequent competitive ELISA uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The analyte concentrations of the standards, controls and samples compete with the solid phase bound analyte concentrations for a fixed number of antibody binding sites. After 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 resulting in a colour reaction. The reaction is monitored at a wavelength of 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standard concentrations. Manual processing of the ELISA is recommended. The use of automatic laboratory equipment is the responsibility of the user. This in-vitro diagnostic is for professional use only.

1.2 Clinical application

The amino acid L-tryptophan is essential for humans [1-4] and is absorbed through the diet [1, 2, 5, 6]. Tryptophan serves as a precursor in the synthesis of the neurotransmitters serotonin [2, 4-6] and tryptamine [2, 6] and the epiphyseal hormone melatonin [4, 7], among others. The enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) converts tryptophan to kynurenine [2, 5, 6]. Increased IDO activity is a sign of immunological dysregulation in humans, which is often described with infections [8] or even neurodegenerative diseases [8]. Furthermore, tryptophan and its metabolites regulate neurobehavioral patterns and may affect well-being (depressive symptoms) [9, 10].

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone, even if these results are assessed in accordance with the quality criteria of the method. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of the patient.

Only in cases where the laboratory results are in an acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient, it can be used for therapeutic consequences.

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 must 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) must be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) If serious incidents should occur in connection with this product, they should be reported to the manufacturer and the competent national authorities.
- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 – 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided. Microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up.
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended.
- (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 for use 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 provided with the kit.
- (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. Rinse contaminated items before reuse.
- (17) For information about 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) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.
- (19) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (20) In case of any severe damage to the test kit or components, the manufacturer has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components must not be used for a test run. They must be stored properly until the manufacturer decides what to do with them. If it is decided that they are no longer suitable for measurements, they must be disposed of in accordance with national regulations.
- (21) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but must be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.

2.2 Limitations

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

2.2.1 Interfering substances and proper handling of specimens

Serum/Plasma

Samples containing precipitates or fibrin strands might cause inaccurate results. Hemolytic samples (up to 2 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 0.5 mg/ml bilirubin) and lipemic samples (up to 16 mg/ml triglycerides) have no influence on the assay results.

If the concentrations cannot be estimated and there are doubts as to whether the above limit values for hemolytic, icteric or lipemic samples are complied with, the samples should not be used in the assay.

2.2.2 Drug and food interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of tryptophan level in the sample. Fasting specimens or pre-feed specimens for children (2 – 3 hours after last meal) are advised.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.




3. Storage and stability


Store kit and reagents at 2 – 8 °C until expiration date. Do not use kit and components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened, the reagents are stable for 2 months when stored at 2 – 8 °C (except reagent BA E-2428, see chapter 6.1). Once the resealable pouch of the ELISA plate has been opened, care should be taken to close it tightly again including the desiccant.

4. Materials

4.1 Contents of the kit

BA D-0024	REAC-PLATE	Reaction plate – ready to use
Content:	1 x 96 well plate, empty in a resealable pouch	
BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil – ready to use
Content:	Adhesive foils in a resealable pouch	
Number:	1 x 4 foils	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate – concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, purple cap	

BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate – ready to use
Content:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
Description:	Species is goat	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate – ready to use
Content:	Chromogenic substrate containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 ml/vial, black cap	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution – ready to use
Content:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 ml/vial, grey cap	
BA E-2413	ASSAY-BUFF	Assay Buffer – ready to use
Content:	Buffer with alkaline pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, yellow cap	
Hazard pictograms:	 	
	GHS08 GHS07	
Signal word:	Danger	
Hazardous ingredients:	Boric acid	
Hazard statements:	H360FD May damage fertility. Suspected of damaging the unborn child.	
Precautionary statements:	P201 Obtain special instructions before use. P280 Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection. P308+P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.	
Additional statements:	Restricted to professional users.	
BA E-2428	EQUA-REAG	Equalizing Reagent – lyophilized
Content:	Lyophilized protein	
Volume:	1 vial, brown cap	
Description:	Species is bovine	
BA E-2446	D-REAGENT	D-Reagent – ready to use
Content:	Crosslinking agent in dimethylsulfoxide	
Volume:	1 x 3 ml/vial, white cap	
Hazard pictograms:		
	GHS07	
Signal word:	Warning	
Hazardous ingredients:	Glutaraldehyde	
Hazard statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.	
Precautionary statements:	P261 Avoid breathing mist/vapours/spray. P280 Wear protective gloves. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.	

BA E-2458	Q-BUFFER	Q-Buffer – ready to use
Content:	TRIS buffer	
Volume:	1 x 20 ml/vial, white cap	
BA E-2710	AS TRYP	Tryptophan Antiserum – ready to use
Content:	Rabbit anti-L-tryptophan antibody in buffer with proteins and non-mercury preservative, blue coloured	
Volume:	1 x 6 ml/vial, blue cap	
Description:	Species of antibody is rabbit, species of protein in buffer is bovine	
BA E-2721	PREC-REAG	Precipitating Reagent – ready to use
Content:	Acidic reagent for precipitation of plasma/serum proteins, red coloured	
Volume:	1 x 4 ml/vial, white cap	
Hazard pictograms:		
	GHS05	
Signal word:	Danger	
Hazardous ingredients:	5-sulphosalicylic acid dihydrate	
Hazard statements:	H314 Causes severe skin burns and eye damage.	
Precautionary statements:	P280 Wear protective gloves, protective clothing, eye protection. P303+P361+P353 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water. P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P310 Immediately call a doctor, a POISON CENTER. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.	
BA E-2731	W TRYP	Tryptophan Microtiter Strips – ready to use
Content:	1 x 96 wells (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable blue pouch with desiccant	
BA E-2788	PBS	PBS – ready to use
Content:	Phosphate buffered saline	
Volume:	1 x 20 ml/vial, orange cap	

4.2 Calibration and Controls

Standards and Controls – ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration [µg/ml] TRYP	Concentration [µmol/l] TRYP	Volume/Vial
BA E-2701	STANDARD A	white	0	0	4 ml
BA E-2702	STANDARD B	yellow	2.5	12.2	4 ml
BA E-2703	STANDARD C	orange	7.5	36.7	4 ml
BA E-2704	STANDARD D	blue	25	122	4 ml
BA E-2705	STANDARD E	grey	75	367	4 ml
BA E-2706	STANDARD F	black	250	1,224	4 ml
BA E-2751	CONTROL 1	green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range.		4 ml
BA E-2752	CONTROL 2	red			4 ml

Conversion: tryptophan [µg/ml] x 4.89 = tryptophan [µmol/l]

Content: Acidic buffer with non-mercury stabilizer, spiked with a defined quantity of tryptophan.

4.3 Additional materials required but not provided in the kit

- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Absorbent material (paper towel)
- Polystyrene or polypropylene tubes and suitable rack

4.4 Additional equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 – 200 µl; 12.5 ml
- Microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 – 650 nm
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Vortex mixer
- Centrifuge

5. Sample collection, handling and storage

Plasma

Whole blood should be collected by venepuncture into centrifuge tubes containing EDTA as anticoagulant (Monovette or Vacuette for plasma) and centrifuge according to manufacturer's instructions at room temperature immediately after collection.

Fasting specimens or pre-feed specimens for children (2 – 3 hours after last meal) are advised.

Hemolytic, 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 months) at < -15 °C.

Serum

Whole blood should be collected by venepuncture into centrifuge tubes (Monovette or Vacuette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation according to manufacturer's instructions at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Samples of patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Fasting specimens or pre-feed specimens for children (2 – 3 hours after last meal) are advised.

Hemolytic, 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 months) at < -15 °C.

Urine

Spontaneous urine (second morning urine) stabilized with 10 µl 6 M HCl per 1 ml of urine sample can be used. The measurement results are related to the creatinine content of the sample.

Storage: up to 48 hours at 2 – 8 °C; up to 6 months at < -15 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided. Avoid exposure to direct sunlight.

6. Test procedure

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the Reaction Plate and microwell plates (Microtiter Strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up). Duplicate determinations are recommended.

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent. 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.

If the product is prepared in parts, unused wells in Reaction Plates should be covered to avoid contamination. After preparation, the used wells must be labelled to prevent double use.

During the overnight incubation at 2 – 8 °C with the antiserum, the temperature should be uniform all over the ELISA plate to avoid any drift and edge-effect.

⚠ *The use of a microtiter plate shaker with the following specifications is mandatory: shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm. Shaking with differing settings might influence the results.*

6.1 Preparation of reagents and further notes

Wash Buffer

Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate **WASH-CONC** **50x** with water to a final volume of 1000 ml.

Storage: 2 months at 2 – 8 °C

Equalizing Reagent

Reconstitute the **EQUA-REAG** with 12.5 ml of **ASSAY-BUFF**. Reconstituted Equalizing Reagent which is not used immediately has to be stored in aliquots for max. 2 months at < -15 °C and may be thawed only once.

D-Reagent

The **D-REAGENT** has a freezing point of 18.5 °C. It must be ensured that the D-Reagent has reached room temperature and forms a homogenous, crystal-free solution.

Storage: 2 months at 2 – 8 °C

Tryptophan 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 Preparation of samples – Precipitation

1. Pipette 20 µl of standards, controls and samples into the respective tubes.
2. Add 200 µl PBS to all tubes.
3. Add 25 µl PREC-REAG to all tubes.
4. Mix the tubes thoroughly (vortex) and centrifuge for 15 min at 3,000 x g .
⚠ Take 25 µl of the clear supernatant for the derivatization .

6.3 Derivatization

1. Pipette 25 µl of the precipitated standards, controls and samples into the respective wells of the REAC-PLATE .
2. Add 50 µl of the Equalizing Reagent into all wells.
3. Add 10 µl of the D-REAGENT into all wells.
4. Cover plate with FOILS and incubate for 2 h at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
5. Add 100 µl of the Q-BUFFER into all wells.
6. Incubate for 10 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
⚠ Use 25 µl for the ELISA!

6.4 Tryptophan ELISA

1. Pipette 25 µl of the derivatized standards, controls and samples into the appropriate wells of the W TRYP .
2. Add 50 µl of the AS TRYP into all wells and mix shortly.
3. Cover plate with FOILS and incubate for 15 – 20 h (overnight) at 2 – 8 °C .
4. Remove the FOILS . Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 3 times by adding 300 µl of Wash Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
5. Add 100 µl of the 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 content of the wells. Wash the plate 3 times by adding 300 µl of Wash Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
8. Add 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-SOLN to each well and shake the microtiter plate shortly.
10. Read the absorbance of the solution in the wells within 10 min, 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	0.73 – 250 µg/ml
-----------------	------------------

The standard curve, which can be used to determine the concentration of the unknown samples, 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) using a concentration of 0.001 µg/ml for Standard A (this alignment is mandatory because of the logarithmic presentation of the data). Use non-linear regression for curve fitting (e.g. 4-parameter, marquardt).

⚠ 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.

Samples found with concentrations higher than the highest standard (Standard F) should be diluted accordingly with water (deionized, distilled, or ultra-pure) and must be re-assayed.

Tryptophan related to the creatinine content of the sample: **mg/g creatinine** = $\frac{\text{mg tryptophan}}{\text{g creatinine}}$

Conversion:

tryptophan [$\mu\text{g/ml}$] x 4.89 = tryptophan [$\mu\text{mol/l}$]

7.1 Expected reference value

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

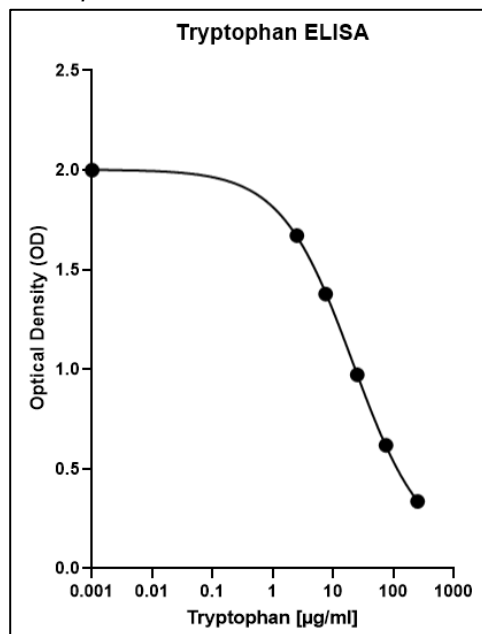
The expected reference values for serum and plasma samples indicated below are based on method comparison studies to LC-MS/MS [4]. The expected reference range for spontaneous urine was determined in an internal study by testing 62 samples (European population) (95% reference interval).

	Plasma/Serum	Spontaneous urine
Expected reference value	9.3 – 17.0 $\mu\text{g/ml}$ 45.5 – 83.1 $\mu\text{mol/l}$	3.2 – 20.5 mg/g creatinine 15.6 – 101 $\mu\text{mol/g creatinine}$ 1.8 – 11.4 mmol/mol creatinine

Values significantly outside the reference range should be assessed by a doctor.

7.2 Typical standard curve

⚠ Example: Do not use for calculation!



8. Control samples

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. Commercially obtained control samples should be treated like unknown samples. Control samples should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC-Report.

9. Assay characteristics

9.1 Performance data

Analytical Sensitivity	
Limit of Blank (LOB)	0.48 µg/ml
Limit of Detection (LOD)	0.65 µg/ml
Limit of Quantification (LOQ)	0.73 µg/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	
Substance	Cross Reactivity [%]
Tryptophan	100
5-Hydroxy-L-Tryptophan	< 0.01
5-Methoxy-L-Tryptophan	< 0.01
Tryptamine	< 0.01
5-Methoxytryptamine	< 0.01
5-Hydroxytryptamine	< 0.01

Precision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample	Mean ± SD [µg/ml]	CV [%]	Sample	Mean ± SD [µg/ml]	CV [%]
1	3.3 ± 0.9	26.7	1	2.8 ± 0.5	17.3
2	7.3 ± 1.1	14.7	2	7.7 ± 1.1	14.2
3	23.2 ± 2.2	9.3	3	23.4 ± 3.4	14.7
4	67.6 ± 4.4	6.4	4	66.4 ± 7.5	11.3

Lot-to-Lot			
	Sample	Mean ± SD [µg/ml]	CV [%]
Tryptophan in artificial matrix (n = 6)	1	6.5 ± 0.22	3.4
	2	31.5 ± 2.1	6.7
Tryptophan in plasma (n = 6)	1	10.1 ± 0.31	3.1
	2	48.5 ± 2.9	6.0

Recovery			
	Range [µg/ml]	Mean [%]	Range [%]
Urine	5.4 – 207	107	100 – 114
Serum	14.9 – 196	96	87 – 108
Plasma	12.1 – 202	100	89 – 110

Linearity		
Serial dilution up to	Mean [%]	Range [%]
1:64	94	73 – 115

Method Comparison: ELISA vs. LC-MS/MS	LC-MS/MS = 1.06x - 2.9; R ² = 0.99; n = 41
--	---

9.2 Metrological Traceability

The values assigned to the standards and controls of the Tryptophan ELISA are traceable to the weighing.

Standards and Controls	Uncertainty [%]
	1.2

Tryptophan ELISA	
Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Expanded Uncertainty [%] $k = 2^*$
2.8	34.1
7.7	28.1
23.4	30.1
66.4	22.1

* This defines an interval about the measured result that will include the true value with a probability of 95%.

10. References/Literature














1. Metcalfe, A.J., et al., *Acute and chronic effects of exercise on the kynurenine pathway in humans - A brief review and future perspectives*. *Physiol Behav*, 2018. **194**: p. 583-587.
2. Platten, M., et al., *Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond*. *Nat Rev Drug Discov*, 2019. **18**(5): p. 379-401.
3. Roager, H.M. and T.R. Licht, *Microbial tryptophan catabolites in health and disease*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 3294.
4. de Jong, W.H., et al., *Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009. **877**(7): p. 603-9.
5. Addi, T., L. Dou, and S. Burtey, *Tryptophan-Derived Uremic Toxins and Thrombosis in Chronic Kidney Disease*. *Toxins (Basel)*, 2018. **10**(10).
6. Cervenka, I., L.Z. Agudelo, and J.L. Ruas, *Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health*. *Science*, 2017. **357**(6349).
7. Xu, K., G. Liu, and C. Fu, *The Tryptophan Pathway Targeting Antioxidant Capacity in the Placenta*. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. **2018**: p. 1054797.
8. Strasser, B., et al., *Kynurenine pathway metabolism and immune activation: Peripheral measurements in psychiatric and co-morbid conditions*. *Neuropharmacology*, 2017. **112**(Pt B): p. 286-296.
9. Wigner, P., et al., *Oxidative and Nitrosative Stress as Well as the Tryptophan Catabolites Pathway in Depressive Disorders*. *Psychiatr Danub*, 2017. **29**(4): p. 394-400.
10. Wigner, P., et al., *The molecular aspects of oxidative & nitrosative stress and the tryptophan catabolites pathway (TRYCATs) as potential causes of depression*. *Psychiatry Res*, 2018. **262**: p. 566-574.

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

11. Changes

Version	Release Date	Chapter	Change
15.0	2023-04-25	All 1. 2.1 2.2.2 3. 4.1 5. 6. 7. 9.1 9.2 10. 11.	- The IFU was revised according to the IVDR regulation (EU) 2017/746 - Introduction updated - Procedural notes, guidelines and warnings updated - Drug and food interferences updated - Shelf life extended after opening - BA E-2446 white cap (old: brown cap), Volume: 3 ml - 24 h collection urine removed - Stability of Wash Buffer and Equalizing Reagent adjusted - Calculation of results specified - Lot-to-Lot added - Metrological traceability added - References/Literature updated - Chapter Changes added
16.0	2024-02-21	4.1	- Hazard labelling updated according to SDS

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von L-Tryptophan in Urin, Serum- und EDTA-Plasmaproben, um die L-Tryptophan-Homöostase zu beurteilen.

Tryptophan liegt im Blut in proteingebundener Form vor. Zur Isolierung von Tryptophan wird zunächst eine Proteinpräzipitation durchgeführt. Danach wird Tryptophan derivatisiert. Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an die feste Phase der Mikrotiterplatte gebunden. Die Analytkonzentrationen der Standards, Kontrollen und Proben und die an die Festphase gebundenen Analytkonzentrationen konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörperkomplexe durch Waschen entfernt. Der an die feste Phase gebundene Antikörper wird mit einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen-Antikörper gebunden und mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Konzentrationen der unbekannt Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen und Abgleich der gemessenen Absorptionen ermittelt. Die manuelle Abarbeitung des ELISAs wird empfohlen. Die Verwendung von automatischen Laborgeräten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Dieses In-Vitro-Diagnostikum ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

1.2 Klinische Anwendung

Die Aminosäure L-Tryptophan ist für den Menschen essenziell [1-4] und wird über die Nahrung aufgenommen [1, 2, 5, 6]. Tryptophan dient als Vorstufe u. a. bei der Synthese der Neurotransmitter Serotonin [2, 4-6] und Tryptamin [2, 6] und des Epiphysenhormons Melatonin [4, 7]. Das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) wandelt Tryptophan in Kynurenin um [2, 5, 6]. Eine erhöhte IDO-Aktivität ist ein Zeichen einer immunologischen Dysregulation im Menschen, die oft mit Infektionen [8] oder auch neurodegenerativen Erkrankungen [8] beschrieben wird. Des Weiteren regulieren Tryptophan und dessen Stoffwechselprodukte neurologische Verhaltensweisen und können sich auf das Wohlbefinden (depressive Symptome) auswirken [9, 10].

Therapeutische Konsequenzen dürfen niemals allein auf Grund von Laborwerten herangezogen werden, auch wenn diese Werte in Übereinstimmung mit den Qualitätskriterien der Methode beurteilt werden. Jedes Laborergebnis trägt immer nur zu einem Teil des klinischen Bildes bei.

Nur wenn die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild stehen, dürfen daraus therapeutische Konsequenzen abgeleitet werden.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

- (1) Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Gebrauchsanweisung 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) Geeignete persönliche Schutzausrüstung (Kittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille) ist zu tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Falls in Zusammenhang mit diesem Produkt schwerwiegende Vorfälle auftreten sollten, sollen diese dem Hersteller und den zuständigen nationalen Behörden gemeldet werden.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Verwenden Sie für Verdünnungs- oder Rekonstitutionszwecke deionisiertes, destilliertes oder ultrareines Wasser. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über einzeln herausnehmbare und abbrechbare Streifen. Ungenutzte Wells müssen bei 2 – 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden. Die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden.
- (8) Proben sollten in Doppelbestimmung gemessen werden.
- (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 Wells 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 der Kitkontrollen können dem QC-Report 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 das Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (18) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potentiell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
- (19) Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (20) Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen sachgerecht gelagert werden, bis der Hersteller entscheidet, wie mit ihnen zu verfahren ist. Sollte entschieden werden, dass sie für Messungen nicht mehr geeignet sind, müssen sie entsprechend den nationalen Richtlinien entsorgt werden.
- (21) 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.

2.2 Grenzen des Tests

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

2.2.1 Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben

Serum/Plasma

Proben, die ein Präzipitat oder die Fibrinfäden enthalten, können zu ungenauen Ergebnissen führen. Hämolytische Proben (bis zu 2 mg/ml Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 0,5 mg/ml Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 16 mg/ml Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse. Sollten die Konzentrationen nicht abzuschätzen sein und Zweifel bestehen, ob die oben genannten Grenzwerte für hämolytische, ikterische oder lipämische Proben eingehalten werden, sollten die Proben nicht im Assay eingesetzt werden.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel

Es gibt keine Stoffe (Medikamente), deren Einnahme die Bestimmung des Tryptophangehaltes in der Probe beeinflusst.

Es wird dazu geraten, Blutproben im nüchternen Zustand – bei Kindern 2 bis 3 Stunden nach der letzten Mahlzeit – zu verwenden.

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt



Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.



3. Lagerung und Haltbarkeit

Das Kit muss bei 2 – 8 °C bis zum Verfalldatum gelagert werden. Das Kit und die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfalldatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 2 Monate stabil, wenn sie bei 2 – 8 °C gelagert werden (ausgenommen Reagenz BA E-2428, siehe Kapitel 6.1). Der einmal geöffnete Folienbeutel der ELISA-Platte sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA D-0024	REAC-PLATE	Reaktionsplatte – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well Platte, leer in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA D-0090	FOILS	Selbstklebende Folie – gebrauchsfertig
Inhalt:	Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Anzahl:	1 x 4 Folien	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Waschpufferkonzentrat – 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel lila	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzymkonjugat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege anti-Kaninchen Immunglobuline, konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot	
Beschreibung:	Spezies ist Ziege	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stopplösung – gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel grau	
BA E-2413	ASSAY-BUFF	Assaypuffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	Puffer mit alkalischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel gelb	
Gefahren- piktogramme:	 	
	GHS08 GHS07	
Signalwort:	Gefahr	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	Borsäure	
Gefahren- hinweise:	H360FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.	
Sicherheits- hinweise:	P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P280 Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz, Gesichtsschutz tragen. P308+P313 BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
Zusätzliche Hinweise:	Nur für gewerbliche Anwender.	
BA E-2428	EQUA-REAG	Ausgleichsreagenz – lyophilisiert
Inhalt:	Lyophilisiertes Protein	
Volumen:	1 Fläschchen, Deckel braun	
Beschreibung:	Spezies ist Rind	

BA E-2446	D-REAGENT	D-Reagenz – gebrauchsfertig
Inhalt:	Crosslinker mit Dimethylsulfoxid	
Volumen:	1 x 3 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
Gefahren- piktogramme:		
	GHS07	
Signalwort:	Achtung	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	Glutaraldehyd	
Gefahren- hinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.	
Sicherheits- hinweise:	P261 Einatmen von Nebel, Aerosol, Dampf vermeiden. P280 Schutzhandschuhe tragen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
BA E-2458	Q-BUFFER	Q-Puffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	TRIS Puffer	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
BA E-2710	AS TRYP	Tryptophan Antiserum – gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen anti-Tryptophan Antikörper im Proteinpuffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel, blau gefärbt	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau	
Beschreibung:	Spezies vom Antikörper ist Kaninchen, Spezies vom Protein im Puffer ist Rind	
BA E-2721	PREC-REAG	Präzipitationsreagenz – gebrauchsfertig
Inhalt:	Saures Reagenz zur Präzipitation der Plasma-/Serumproteine, rot gefärbt	
Volumen:	1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
Gefahren- piktogramme:		
	GHS05	
Signalwort:	Gefahr	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	5-Sulfosalicylsäure Dihydrat	
Gefahren- hinweise:	H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.	
Sicherheits- hinweise:	P280 Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz tragen. P303+P361+P353 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P310 Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM, Arzt anrufen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
BA E-2731	LI TRYP	Tryptophan Mikrotiterstreifen – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Wells (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA E-2788	PBS	PBS – gebrauchsfertig
Inhalt:	Phosphatgepufferte Salzlösung	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel orange	

4.2 Kalibratoren und Kontrollen

Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration [µg/ml] TRYP	Konzentration [µmol/l] TRYP	Volumen/ Fläschchen
BA E-2701	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA E-2702	STANDARD B	gelb	2,5	12,2	4 ml
BA E-2703	STANDARD C	orange	7,5	36,7	4 ml
BA E-2704	STANDARD D	blau	25	122	4 ml
BA E-2705	STANDARD E	grau	75	367	4 ml
BA E-2706	STANDARD F	schwarz	250	1.224	4 ml
BA E-2751	CONTROL 1	grün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Vertrauensbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.		4 ml
BA E-2752	CONTROL 2	rot			4 ml

Umrechnung: Tryptophan [µg/ml] x 4,89 = Tryptophan [µmol/l]

Inhalt: Saurer Puffer mit quecksilberfreien Stabilisatoren, aufgestockt mit einer definierten Menge Tryptophan.

4.3 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien

- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage
- Polystyrol oder Polypropylen Röhren mit passendem Ständer

4.4 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 – 200 µl; 12,5 ml
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer mit 450 nm und, wenn möglich, 620 – 650 nm Filter zur Auswertung von Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplattenschüttler (Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm)
- Vortex-Mischer
- Zentrifuge

5. Probensammlung, -behandlung und -lagerung

Plasma

Das durch Venenpunktion entnommene Vollblut in einem für EDTA-Plasma vorgesehenen Blutentnahmeröhrchen (Plasma Monovette oder Vacuette) sammeln und das Plasma direkt durch Zentrifugation (nach Angaben des Herstellers) von den übrigen Blutbestandteilen trennen.

Es wird dazu geraten, Blutproben im nüchternen Zustand – bei Kindern 2 – 3 Stunden nach der letzten Mahlzeit – zu verwenden.

Hämolytische, ikterische und lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: Bis zu 48 Stunden bei 2 – 8 °C; bis zu 6 Monate bei < -15 °C.

Serum

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

Es wird dazu geraten, Blutproben im nüchternen Zustand – bei Kindern 2 bis 3 Stunden nach der letzten Mahlzeit – zu verwenden.

Hämolytische, ikterische und lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: Bis zu 48 Stunden bei 2 – 8 °C; bis zu 6 Monate bei < -15 °C.

Urin

Es kann Spontanurin (2. Morgenurin) verwendet werden, stabilisiert mit 10 µl 6 M HCl auf 1 ml Urin. Die Messergebnisse werden auf den Kreatiningehalt der Probe bezogen.

Lagerung: Bis zu 48 Stunden bei 2 – 8 °C; bis zu 6 Monate bei < -15 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sowie direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Reaktions- und Mikrotiterplatten müssen beschriftet werden (die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden). Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.

Die Bindung des Antikörpers, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassays liegt zwischen 20 – 25 °C.

Wenn das Produkt in Teilen angesetzt wird, sollen nicht benötigte Wells in Reaktionsplatten abgedeckt werden, um Verschmutzungen zu vermeiden. Nach dem Ansatz müssen die benutzten Wells gekennzeichnet werden, damit eine Doppelnutzung ausgeschlossen wird.

Während der Übernacht-Inkubation mit dem Antiserum bei 2 – 8 °C, sollte über die gesamte ELISA-Platte hinweg eine gleichmäßige Temperatur vorliegen, um jeglichen Drift und Randeffect zu vermeiden.

⚠ *Der verwendete Mikrotiterplattenschüttler muss folgende Spezifikationen haben: Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm. Schütteln mit abweichenden Einstellungen kann die Ergebnisse beeinflussen.*

6.1 Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC 50x** mit Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

Ausgleichsreagenz

Den Inhalt eines Fläschchens **EQUA-REAG** mit 12,5 ml **ASSAY-BUFF** lösen. Rekonstituiertes Ausgleichsreagenz, welches nicht benötigt wird, sollte umgehend aliquotiert und für maximal 2 Monate bei < -15 °C gelagert werden (nur einmal auftauen).

D-Reagenz

Das **D-REAGENT** hat einen Gefrierpunkt von 18,5 °C. Es muss sichergestellt sein, dass es vor der Verwendung Raumtemperatur angenommen hat und eine homogene, kristallfreie Lösung bildet.

Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

Tryptophan Mikrotiterstreifen

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

6.2 Probenvorbereitung – Präzipitation

1. Jeweils 20 µl der Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhrrchen pipettieren.
2. 200 µl PBS zu allen Röhrrchen hinzugeben.
3. 25 µl PREC-REAG zu allen Röhrrchen hinzugeben.
4. Röhrrchen sorgfältig mischen (Vortex) und für 15 Min bei 3000 x g zentrifugieren.
⚠ Jeweils 25 µl des klaren Überstands für die Derivatisierung verwenden!

6.3 Derivatisierung

1. Jeweils 25 µl der präzipitierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells der REAC-PLATE pipettieren.
2. 50 µl Ausgleichsreagenz in alle Wells pipettieren.
3. 10 µl D-REAGENT in alle Wells pipettieren.
4. Platte mit FOILS abdecken und 2 h bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
5. 100 µl Q-BUFFER in alle Wells pipettieren.
6. Für 10 min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
⚠ Jeweils 25 µl für den ELISA verwenden!

6.4 Tryptophan ELISA

1.	25 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells der TRYP pipettieren.
2.	50 µl AS TRYP in alle Wells hinzugeben und kurz schütteln.
3.	Platte mit FOILS abdecken und für 15 – 20 h (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren.
4.	FOILS entfernen und den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells 3-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 Wells pipettieren.
6.	Für 30 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
7.	Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells 3-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 Wells 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 Wells pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
10.	Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm (falls vorhanden gegen eine Referenzwellenlänge zwischen 620 und 650 nm) innerhalb von 10 Min messen .

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	0,73 – 250 µg/ml
--------------------	------------------

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntenen Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standardabsorptionen (Berechnung der mittleren Absorption, linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) mit einer Konzentration von 0,001 µg/ml für Standard A (diese Ausrichtung ist aufgrund der logarithmischen Darstellung der Daten erforderlich) erstellt. Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: 4-parameter, marquardt) 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. Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (Standard F) gefunden werden, müssen entsprechend mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) verdünnt und nochmals bestimmt werden.

Tryptophan auf den Kreatiningehalt der Urinprobe bezogen: **mg/g Kreatinin** = $\frac{\text{mg Tryptophan}}{\text{g Kreatinin}}$

Umrechnung

Tryptophan [µg/ml] x 4,89 = Tryptophan [µmol/l]

7.1 Erwartete Referenzbereiche

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

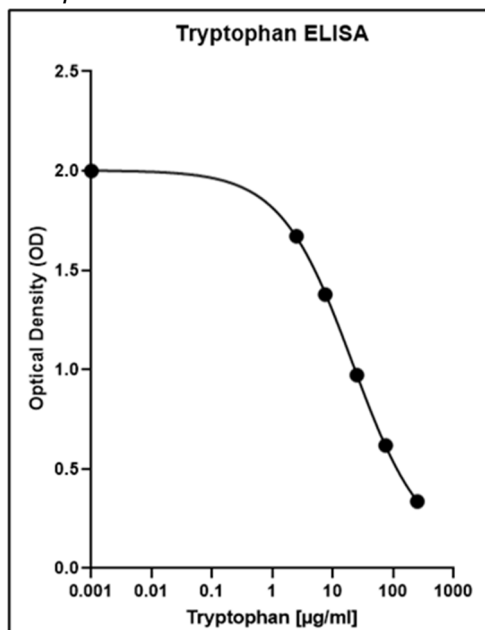
Die unten angegebenen erwarteten Referenzwerte für Serum- und Plasmaproben beruhen auf Methodenvergleichsstudien zu LC-MS/MS [4]. Der erwartete Referenzbereich für Spontanurin wurde in einer internen Studie durch Untersuchung von 62 Proben (europäische Bevölkerung) ermittelt (95% Referenzintervall).

	Plasma/Serum	Spontanurin
Erwarteter Referenzbereich	9,3 – 17,0 µg/ml 45,5 – 83,1 µmol/l	3,2 – 20,5 mg/g Kreatinin 15,6 – 101 µmol/g Kreatinin 1,8 – 11,4 mmol/mol Kreatinin

Deutlich außerhalb des Referenzbereichs liegende Werte sollen ärztlich bewertet werden.

7.2 Typische Standardkurve

⚠️ *Beispiel: Bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



8. Kontrollproben

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen Vorschriften zu verwenden. Verwenden Sie Kontrollen im normalen und pathologischen Bereich. Kommerzielle Kontrollproben müssen dabei wie die unbekanntes Proben behandelt werden. Kontrollproben sollten innerhalb der festgelegten Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report angegeben.

9. Assaycharakteristika

9.1 Leistungsdaten

Analytische Sensitivität	
Limit of Blank (LOB)	0,48 µg/ml
Limit of Detection (LOD)	0,65 µg/ml
Limit of Quantification (LOQ)	0,73 µg/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)	
Substanz	Kreuzreaktion [%]
Tryptophan	100
5-Hydroxy-L-Tryptophan	< 0,01
5-Methoxy-L-Tryptophan	< 0,01
Tryptamin	< 0,01
5-Methoxytryptamin	< 0,01
5-Hydroxytryptamin	< 0,01

Präzision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Probe	Mittelwert ± SD [µg/ml]	CV [%]	Probe	Mittelwert ± SD [µg/ml]	CV [%]
1	3,3 ± 0,9	26,7	1	2,8 ± 0,5	17,3
2	7,3 ± 1,1	14,7	2	7,7 ± 1,1	14,2
3	23,2 ± 2,2	9,3	3	23,4 ± 3,4	14,7
4	67,6 ± 4,4	6,4	4	66,4 ± 7,5	11,3

Lot-zu-Lot			
	Probe	Mittelwert ± SD [µg/ml]	CV [%]
Tryptophan in künstlicher Matrix (n = 6)	1	6,5 ± 0,22	3,4
	2	31,5 ± 2,1	6,7
Tryptophan in Plasma (n = 6)	1	10,1 ± 0,31	3,1
	2	48,5 ± 2,9	6,0

Wiederfindung			
	Bereich [µg/ml]	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Urin	5,4 – 207	107	100 – 114
Serum	14,9 – 196	96	87 – 108
Plasma	12,1 – 202	100	89 – 110

Linearität		
Serielle Verdünnung bis	Mittelwert [%]	Bereich [%]
1:64	94	73 – 115

Methodenvergleich: ELISA vs. LC-MS/MS	LC-MS/MS = 1,06x - 2,9; R ² = 0,99; n = 41
--	---

9.2 Metrologische Rückführbarkeit

Die den Standards und Kontrollen des Tryptophan ELISA zugeordneten Werte sind auf die Wägung rückführbar.

Standards und Kontrollen	Unsicherheit [%]
	1,2

Tryptophan ELISA	
Konzentration [µg/ml]	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
2,8	34,1
7,7	28,1
23,4	30,1
66,4	22,1

* Das Intervall der maximalen erweiterten Unsicherheit ist der Bereich, in dem der wahre Messwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% um den gemessenen Wert liegt.

10. Referenzen/Literatur

1. Metcalfe, A.J., et al., *Acute and chronic effects of exercise on the kynurenine pathway in humans - A brief review and future perspectives*. *Physiol Behav*, 2018. **194**: p. 583-587.
2. Platten, M., et al., *Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond*. *Nat Rev Drug Discov*, 2019. **18**(5): p. 379-401.
3. Roager, H.M. and T.R. Licht, *Microbial tryptophan catabolites in health and disease*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 3294.
4. de Jong, W.H., et al., *Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009. **877**(7): p. 603-9.
5. Addi, T., L. Dou, and S. Burtsey, *Tryptophan-Derived Uremic Toxins and Thrombosis in Chronic Kidney Disease*. *Toxins (Basel)*, 2018. **10**(10).
6. Cervenka, I., L.Z. Agudelo, and J.L. Ruas, *Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health*. *Science*, 2017. **357**(6349).
7. Xu, K., G. Liu, and C. Fu, *The Tryptophan Pathway Targeting Antioxidant Capacity in the Placenta*. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. **2018**: p. 1054797.









8. Strasser, B., et al., *Kynurenine pathway metabolism and immune activation: Peripheral measurements in psychiatric and co-morbid conditions*. *Neuropharmacology*, 2017. **112**(Pt B): p. 286-296.
9. Wigner, P., et al., *Oxidative and Nitrosative Stress as Well as the Tryptophan Catabolites Pathway in Depressive Disorders*. *Psychiatr Danub*, 2017. **29**(4): p. 394-400.
10. Wigner, P., et al., *The molecular aspects of oxidative & nitrosative stress and the tryptophan catabolites pathway (TRYCATs) as potential causes of depression*. *Psychiatry Res*, 2018. **262**: p. 566-574.

Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anfrage von Ihrem Anbieter gerne zur Verfügung gestellt.

11. Änderungen

Version	Freigabedatum	Kapitel	Änderung
15.0	2023-04-25	Alle 1. 2.1 2.2.2 3. 4.1 5. 6. 7. 9.1. 9.2 10. 11.	- Die IFU wurde gemäß der IVDR-Verordnung (EU) 2017/746 überarbeitet - Einleitung aktualisiert - Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen aktualisiert - Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel aktualisiert - Haltbarkeit nach Öffnen verlängert - BA E-2446 weißer Deckel (alt: braun), Volumen: 3ml - Sammelurin entfernt - Stabilität von Waschpuffer und Ausgleichsreagenz angepasst - Auswertung genauer beschrieben - Lot-to-Lot hinzugefügt - Metrologische Rückführbarkeit hinzugefügt - Referenzen/Literatur aktualisiert - Kapitel Änderungen zugefügt
16.0	2024-02-21	4.1	- Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten	CONT	Inhalt	CE	CE-Kennzeichnung
	Achtung	REF	Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				