

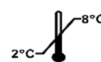
**Instructions for use / Gebrauchsanweisung**

**Kynurenine ELISA**

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

**REF**

**BA E-2200**



**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	5
2.2.2	Drug 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	6
4.3	Additional materials required but not provided in the kit	7
4.4	Additional equipment required but not provided in the kit	7
5.	Sample collection and storage	7
6.	Test procedure	7
6.1	Preparation of reagents and further notes	7
6.2	Preparation of samples – Acylation	8
6.3	Kynurenine ELISA	8
7.	Calculation of results	8
7.1	Expected reference value	8
7.2	Typical standard curve	9
8.	Controls	9
9.	Assay characteristics	9
9.1	Performance data	9
9.2	Metrological Traceability	10
10.	References/Literature	10
11.	Changes	11

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	12
1.1	Verwendungszweck und Testprinzip	12
1.2	Klinische Anwendung	12
2.	Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen	12
2.1	Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen	12
2.2	Grenzen des Tests	13
2.2.1	Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben	13
2.2.2	Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel	13
2.2.3	High-Dose-Hook Effekt	13
3.	Lagerung und Haltbarkeit	14
4.	Materialien	14
4.1	Reagenzien im Kit	14
4.2	Kalibratoren und Kontrollen	15
4.3	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien	15
4.4	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte	15
5.	Probenbehandlung und Lagerung	15
6.	Testdurchführung	15
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und Hinweise	16
6.2	Probenvorbereitung – Azylierung	16
6.3	Kynurenin ELISA	16
7.	Berechnung der Ergebnisse	17
7.1	Erwartete Referenzbereiche	17
7.2	Typische Standardkurve	17
8.	Kontrollproben	17
9.	Assaycharakteristika	18
9.1	Leistungsdaten	18
9.2	Metrologische Rückführbarkeit	19
10.	Referenzen/Literatur	19
11.	Änderungen	20

## **1. Introduction**

### **1.1 Intended use and principle of the test**

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of L-kynurenine in serum and EDTA-plasma samples to evaluate L-kynurenine homeostasis.

During acylation, kynurenine is activated at 37 °C and subsequently coupled to a protein. The competitive ELISA following sample preparation is based on the microtiter plate format. The antigen (kynurenine) is bound to the solid phase. The analyte concentrations of the acylated standards, controls and samples and the analyte concentrations bound to the solid phase, compete for the available binding sites of the antibodies. When the system is in equilibrium, the free antigens and free antigen-antibody complexes are removed by washing. The antigen-antibody complex bound to the solid phase is determined with an enzyme-labelled antibody and detected with a substrate by a colour reaction. The reaction is measured at 450 nm. The concentrations of the unknown samples are determined using a standard curve and matching the measured absorbance.

Manual processing is recommended. The use of laboratory automation is the responsibility of the user. This IVD is intended for professional use only.

### **1.2 Clinical application**

Kynurenine is a non-proteinogenic amino acid that is produced as a metabolic intermediate during the degradation of tryptophan [1 – 5]. The degradation of tryptophan is catalyzed by the inducible enzyme indolamine-2,3-dioxygenase (IDO). The product is kynurenine [4, 6 – 8]. Cytokines, in particular interferon- $\gamma$  [5, 9, 10], influence the activity of the IDO, so that is why the kynurenine path is closely linked to the immune system [9, 11]. Kynurenine can be further converted to neuroprotective kynurenic acid, but also to neurotoxic quinolinic acid [6, 11].

Disorders of the tryptophan kynurenine metabolism are associated with different disease patterns, such as stress, cancer [1, 2, 12], and depression [6, 13 – 17]. 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 [6, 14]. If no increased IDO activity is detected, the administered tryptophan can serve as the starting product for serotonin synthesis [18].

If the kynurenine value is outside the reference range, the results should be clarified with a therapist or physician to discuss further action.

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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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.
- (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 have to 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

#### Serum/Plasma

Hemolytic samples (up to 4 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 0.5 mg/ml bilirubin) and lipemic samples (up to 17 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 interferences

Following substances (drugs) are able to interfere with the concentration of kynurenine level in the sample through ingestion: efavirenz, ezetimib/simvastatin, hydrocortisone, 4-hydroxybutanoic acid, navoximod, ACE inhibitors (angiotensin-converting enzyme inhibitor) and ARBs (angiotensin II type 1 receptor blockers) can lower the kynurenine level. Alcohol, interferon-alpha and nivolumab, on the other hand, can increase the kynurenine level.

### 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 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. Once the resealable pouch 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**      **REACT-PLATE 96**      **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

Volume:            1 x 4 foils

<b>BA E-0030</b>	<b>WASH-CONC</b> <b>50x</b>	<b>Wash Buffer Concentrate</b> – concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, purple cap	
<b>BA E-0040</b>	<b>CONJUGATE</b>	<b>Enzyme Conjugate</b> – ready to use
Content:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
Description:	Species is goat	
<b>BA E-0055</b>	<b>SUBSTRATE</b>	<b>Substrate</b> – ready to use
Content:	Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 ml/vial, black cap	
<b>BA E-0080</b>	<b>STOP-SOLN</b>	<b>Stop Solution</b> – ready to use
Content:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 ml/vial, grey cap	
Hazards identification:		H290 May be corrosive to metals.
<b>BA E-2210</b>	<b>AS</b> <b>KYN</b>	<b>Kynurenine Antiserum</b> – ready to use
Content:	Rabbit Anti-Kynurenine antibody, in protein containing buffer, blue coloured	
Volume:	1 x 6 ml/vial, blue cap	
Description:	Species of the antibody is rabbit; Species of the protein in buffer is bovine	
<b>BA E-2211</b>	<b>ACYL-BUFF</b>	<b>Acylation Buffer</b> ready to use
Content:	2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) buffer	
Volume:	1 x 30 ml/vial, brown cap	
<b>BA E-2212</b>	<b>ACYL-REAG</b>	<b>Acylation Reagent</b> – ready to use
Content:	Acylation reagent in dimethylsulfoxide (DMSO)	
Volume:	1 x 3 ml/vial, white cap	
<b>BA E-2231</b>	<b>W</b> <b>KYN</b>	<b>Kynurenine Microtiter Strips</b> – ready to use
Content:	1 x 96 Well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant	

## 4.2 Calibration and Controls

**Standards and Controls** – ready to use

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

Conversion: kynurenine [ng/ml] x 4.8 = kynurenine [nmol/l]

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

#### 4.3 Additional materials required but not provided in the kit

- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)

#### 4.4 Additional equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 – 300 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
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Vortex mixer
- Temperature controlled incubator (37 °C) or similar heating device

### 5. Sample collection and storage

Repeated thawing and freezing of all samples should be avoided! Fasting specimens are advised.

#### Plasma

Whole blood should be collected by venepuncture into centrifuge tubes containing EDTA as anticoagulant and centrifuge according to manufacturer's instructions immediately after collection.

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 to -30 °C.

#### Serum

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

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 to -30 °C.

### 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 plate (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 Plate should be covered to avoid contamination. After preparation, the used wells must be labeled 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 1,000 ml.

Storage: 2 months at 2 – 8 °C

##### Acylation Reagent

The Acylation Reagent **ACYL-REAG** has a freezing point of 18.5 °C. To ensure that the Acylation Reagent forms a homogenous, 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 Preparation of samples – Acylation

1.	Pipette <b>10 µl</b> of <b>standards, controls</b> und <b>samples</b> into the respective wells of the <b>REAC-PLATE 96</b> .
2.	Add <b>250 µl</b> <b>ACYL-BUFF</b> to all wells.
3.	Add <b>25 µl</b> <b>ACYL-REAG</b> to all wells and incubate <b>1 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
4.	Cover the plate with <b>FOIL</b> and incubate for <b>90 min</b> at <b>37 °C</b> .
⚠	Take <b>20 µl</b> of the prepared <b>standards, controls</b> and <b>samples</b> for the <b>Kynurenine ELISA</b> .

## 6.3 Kynurenine ELISA

1.	Pipette <b>20 µl</b> of the <b>acylated standards, controls</b> and <b>samples</b> into the appropriate wells of the <b>W KYN</b> .
2.	Add <b>50 µl</b> of the <b>AS KYN</b> into all wells and mix shortly.
3.	Cover plate with <b>FOIL</b> and incubate for <b>15 – 20 h</b> (overnight) at <b>2 – 8 °C</b> .
4.	Remove the foil. Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate <b>4 times</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash buffer</b> , <b>discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.
5.	Add <b>100 µl</b> of the <b>CONJUGATE</b> into each well.
6.	Incubate <b>30 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm).
7.	Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate <b>4 times</b> by adding <b>300 µl</b> of <b>Wash buffer</b> , <b>discarding</b> the content and <b>blotting dry each time</b> by tapping the inverted plate on absorbent material.
8.	Add <b>100 µl</b> of the <b>SUBSTRATE</b> into each well an incubate for <b>20 – 30 min</b> at <b>RT</b> (20 – 25 °C) on a <b>shaker</b> (approx. 600 rpm). <b>Avoid exposure to direct sunlight!</b>
9.	Pipette <b>100 µl</b> of the <b>STOP-SOLN</b> into each well and shake the microtiter plate shortly.
10.	<b>Read</b> the absorbance of the solution in the wells within 10 min, using a microtiter plate reader set to <b>450 nm</b> (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

## 7. Calculation of results

<b>Measuring range</b>	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) using a concentration of 0.001 ng/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 concentration of the analyte. OD-values found below the highest standard (Standard F) correspond to high concentration of the analyte in the sample.*

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 with the included Standard A **STANDARD A** and have to be re-assayed.

### Conversion:

kynurenine [ng/ml] x 4.8 = kynurenine [nmol/l]

### 7.1 Expected reference value

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

The expected reference values indicated below are based on method comparison studies to XLC-MS/MS [5].

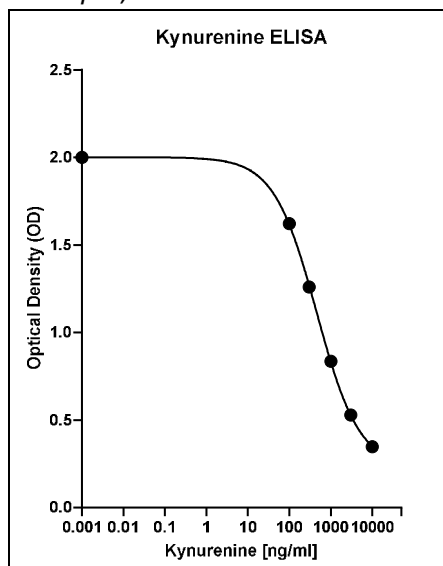
<b>expected reference value</b>	serum/plasma	237.4 – 754.2 ng/ml 1,140 – 3,620 nmol/l
---------------------------------	--------------	---

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



## 7.2 Typical standard curve

⚠ Example, do not use for calculation!



## 8. Controls

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

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. Control samples should fall within established confidence limits.

## 9. Assay characteristics

### 9.1 Performance data

Analytical Sensitivity	
Limit of Blank (LOB)	32.2 ng/ml
Limit of Detection (LOD)	45.7 ng/ml
Limit of Quantification (LOQ)	63.3 ng/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	
Substance	Cross Reactivity [%]
L-Kynurenine	100
5-Hydroxy-DL-Tryptophan, Tyrosine, Phenylalanine, Serotonin, L-Asparagine, Kynurenic acid	0.05
Tryptophan	0.18
3-Hydroxy-DL-Kynurenine	0.3

Precision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Sample	Mean ± SD [ng/ml]	CV [%]		Sample	Mean ± SD [ng/ml]	CV [%]
serum	1	389 ± 48.9	12.6	serum	1	376 ± 67	17.7
	2	989 ± 108	11.0		2	889 ± 120	13.5
	3	2,324 ± 256	11.0		3	2,047 ± 203	14.8
plasma	1	400 ± 61.8	15.5	plasma	1	354 ± 45	12.6
	2	984 ± 120	12.2		2	867 ± 62	7.1
	3	2,230 ± 305	13.8		3	1,916 ± 168	8.8

<b>Lot-to-Lot</b>			
	Sample	Mean ± SD [ng/ml]	CV [%]
Kynurenine in artificial matrix (n = 3)	1	591 ± 35.7	6.0
	2	1,655 ± 33.5	2.0
Kynurenine in plasma (n = 3)	1	612 ± 33.9	5.5
	2	1,687 ± 54.7	3.2

<b>Recovery</b>			
	Sample	Mean [%]	Range [%]
serum	1	101	90 – 109
	2	93	90 – 96
	3	109	95 – 118
plasma	1	96	82 – 106
	2	99	90 – 104
	3	103	97 – 110

<b>Linearity</b>			
	Serial dilution up to	Mean [%]	Range [%]
serum	1:128	95	90 – 104
plasma	1:128	94	89 – 102

<b>Method comparison: ELISA versus XLC-MS/MS</b>	XLC-MS/MS = 0.9x + 71.5; r <sup>2</sup> = 0.9355; n = 30
--	--

## 9.2 Metrological Traceability

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

<b>Standards and Controls</b>	Uncertainty [%]
	1.3

<b>Kynurenine ELISA</b>	plasma	concentration [ng/ml]	Expanded Uncertainty [%] k = 2*
		354	25.3
		867	14.4
	serum	concentration [ng/ml]	Expanded Uncertainty [%] k = 2*
		376	35.5
		889	27.1

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

## 10. References/Literature

- Konishi, M., et al., *Impact of Plasma Kynurenine Level on Functional Capacity and Outcome in Heart Failure-Results From Studies Investigating Co-morbidities Aggravating Heart Failure (SICA-HF)*. Circ J, 2016. **81**(1): p. 52-61.
- Li, H., et al., *Metabolomic adaptations and correlates of survival to immune checkpoint blockade*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4346.
- 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.
- Zinellu, A., et al., *Impact of cholesterol lowering treatment on plasma kynurenine and tryptophan concentrations in chronic kidney disease: relationship with oxidative stress improvement*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2015. **25**(2): p. 153-9.
- 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.
- Barone, P., *The 'Yin' and the 'Yang' of the kynurenine pathway: excitotoxicity and neuroprotection imbalance in stress-induced disorders*. Behav Pharmacol, 2019. **30**(2 and 3-Spec Issue): p. 163-186.
- Keegan, M.R., et al., *Tryptophan metabolism and its relationship with central nervous system toxicity in people living with HIV switching from efavirenz to dolutegravir*. J Neurovirol, 2019. **25**(1): p. 85-90.














8. Kim, Y.K. and S.W. Jeon, *Neuroinflammation and the Immune-Kynurenine Pathway in Anxiety Disorders*. *Curr Neuropharmacol*, 2018. **16**(5): p. 574-582.
9. Lim, C.K., et al., *Involvement of the kynurenine pathway in the pathogenesis of Parkinson's disease*. *Prog Neurobiol*, 2017. **155**: p. 76-95.
10. 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.
11. Look, M.P., et al., *Parallel decrease in neurotoxin quinolinic acid and soluble tumor necrosis factor receptor p75 in serum during highly active antiretroviral therapy of HIV type 1 disease*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000. **16**(13): p. 1215-21.
12. Labadie, B.W., R. Bao, and J.J. Luke, *Reimagining IDO Pathway Inhibition in Cancer Immunotherapy via Downstream Focus on the Tryptophan-Kynurenine-Aryl Hydrocarbon Axis*. *Clin Cancer Res*, 2019. **25**(5): p. 1462-1471.
13. Bonaccorso, S., et al., *Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system*. *J Clin Psychopharmacol*, 2002. **22**(1): p. 86-90.
14. Bryleva, E.Y. and L. Brundin, *Kynurenine pathway metabolites and suicidality*. *Neuropharmacology*, 2017. **112**(Pt B): p. 324-330.
15. Dornbierer, D.A., et al., *Nocturnal Gamma-Hydroxybutyrate Reduces Cortisol-Awakening Response and Morning Kynurenine Pathway Metabolites in Healthy Volunteers*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2019. **22**(10): p. 631-639.
16. Murakami, Y., et al., *Depressive symptoms as a side effect of Interferon-alpha therapy induced by induction of indoleamine 2,3-dioxygenase 1*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 29920.
17. Rudzki, L., et al., *Probiotic Lactobacillus Plantarum 299v decreases kynurenine concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind, randomized, placebo controlled study*. *Psychoneuroendocrinology*, 2019. **100**: p. 213-222.
18. Sorgdrager, F.J.H., et al., *Hydrocortisone Affects Fatigue and Physical Functioning Through Metabolism of Tryptophan: A Randomized Controlled Trial*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018. **103**(9): p. 3411-3419.

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

## 11. Changes

Version	Release Date	Chapter	Change
17.0	2022-11-28	All	- The IFU was revised according to the IVDR regulation (EU) 2017/746
		1.	- Introduction
		2.1	- Procedural notes, guidelines and warnings
		2.2.1	- Interfering substances
		3.	- Shelf life after opening changed to 2 months
		4.1	- BA E-2212 Acylation Reagent now with white cap
		5.	- Sample collection and storage
		7.	- Calculation of results clarified
		7.1	- Reference range in nmol/l added
		7.2	- Typical standard curve updated
		9.1	- Lot-to-Lot and LOB/LOQ added
		9.2	- Metrological traceability added
		10.	- References updated
		11.	- Changes added

## 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-Kynurenin in Serum- und EDTA-Plasmaproben, um die L-Kynurenin-Homöostase zu beurteilen.

Während der Azylierung wird Kynurenin bei 37 °C aktiviert und anschließend an ein Protein gekoppelt. Der sich an die Probenvorbereitung anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen (Kynurenin) ist an die feste Phase gebunden. Die Analytkonzentrationen der azylierten Standards, Kontrollen und Proben und die an der festen Phase gebundenen Analytkonzentrationen, 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 Antigen-Antikörper-Komplex wird mit einem enzymmarkierten Antikörper bestimmt und mit einem Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen. Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve und Abgleich der gemessenen Absorption ermittelt.

Die manuelle Abarbeitung wird empfohlen. Der Einsatz von Laborautomaten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Dieses IVD ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

### **1.2 Klinische Anwendung**

Kynurenin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die als Stoffwechselintermediat während der Degradation von Tryptophan entsteht [1 – 5]. Die Degradation von Tryptophan wird von dem induzierbaren Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) katalysiert und als Produkt Kynurenin gebildet [4, 6 – 8]. Cytokine, insbesondere Interferon- $\gamma$  [5, 9, 10], beeinflussen die Aktivität der IDO, sodass der Kynureninpfad eng an das Immunsystem gekoppelt ist [9, 11]. Kynurenin kann weiter zur neuroprotektiven Kynureninsäure, aber auch zur neurotoxischen Quinolinsäure umgewandelt werden [6, 11].

Störungen des Tryptophan-Kynurenin Metabolismus werden mit unterschiedlichen Krankheitsbildern, z. B. Stress, Krebs [1, 2, 12] sowie depressiver Formenkreis [6, 13 – 17] 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 [6, 14]. Wird keine erhöhte IDO-Aktivität nachgewiesen, kann das verabreichte Tryptophan als Ausgangsprodukt zur Serotonin-Synthese dienen [18].

Liegt der Kynureninwert außerhalb des Referenzbereichs, sollten die Ergebnisse mit einem Therapeuten oder Mediziner abgeklärt werden, um ein weiteres Vorgehen zu besprechen.

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 °C bis 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.
- (22) 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

Hämolytische Proben (bis zu 4 mg/ml Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 0,5 mg/ml Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 17 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

Folgende Stoffe (Medikamente) können bei Einnahme die Konzentration des Kynureningehaltes in der Probe beeinflussen: Efavirenz, Ezetimib/Simvastatin, Hydrokortison, 4-Hydroxybutansäure, Navoximod, ACE-Inhibitoren (Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitor) und ARBs (Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptorblocker) können den Kynureningehalt erniedrigen. Alkohol, Interferon-alpha und Nivolumab hingegen können den Kynureningehalt ansteigen lassen.

### 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 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. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

### 4. Materialien

#### 4.1 Reagenzien im Kit

<b>BA D-0024</b>	<b>REACT-PLATE 96</b>	<b>Reaktionsplatte</b> – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well Platte, leer in einem wiederverschließbaren Beutel	
<b>BA D-0090</b>	<b>FOILS</b>	<b>Selbstklebende Folie</b> – gebrauchsfertig
Inhalt:	Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Volumen:	1 x 4 Folien	
<b>BA E-0030</b>	<b>WASH-CONC 50x</b>	<b>Waschpufferkonzentrat</b> – 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel lila	
<b>BA E-0040</b>	<b>CONJUGAT</b>	<b>Enzymkonjugat</b> – gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot	
Beschreibung:	Spezies ist Ziege	
<b>BA E-0055</b>	<b>SUBSTRATE</b>	<b>Substrat</b> – gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz	
<b>BA E-0080</b>	<b>STOP-SOLN</b>	<b>Stopplösung</b> – gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel grau	
Gefahrenhinweise:		H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
<b>BA E-2210</b>	<b>AS KYN</b>	<b>Kynurenin Antiserum</b> – gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen anti-Kynurenin Antikörper in proteinhaltigem Puffer, blau gefärbt	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau	
Beschreibung:	Spezies des Antikörpers ist Kaninchen; Spezies des Proteins im Puffer ist Rind	
<b>BA E-2211</b>	<b>ACYL-BUFF</b>	<b>Azylierungspuffer</b> – gebrauchsfertig
Inhalt:	2-(N-Morpholino) Ethansulfonsäure (MES) Puffer	
Volumen:	1 x 30 ml/Fläschchen, Deckel braun	
<b>BA E-2212</b>	<b>ACYL-REAG</b>	<b>Azylierungsreagenz</b> – gebrauchsfertig
Inhalt:	Azylierungsmittel in Dimethylsulfoxid (DMSO)	
Volumen:	1 x 3 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
<b>BA E-2231</b>	<b>W KYN</b>	<b>Kynurenin Mikrotiterstreifen</b> – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Beutel	

## 4.2 Kalibratoren und Kontrollen

### Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig

Artikelnummer	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration [ng/ml] <small>KYN</small>	Konzentration [nmol/l] <small>KYN</small>	Volumen/Fläschchen
BA E-2201	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA E-2202	STANDARD B	gelb	100	480	4 ml
BA E-2203	STANDARD C	orange	300	1.440	4 ml
BA E-2204	STANDARD D	blau	1.000	4.800	4 ml
BA E-2205	STANDARD E	grau	3.000	14.400	4 ml
BA E-2206	STANDARD F	schwarz	10.000	48.000	4 ml
BA E-2251	CONTROL 1	grün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Vertrauensbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.		4 ml
BA E-2252	CONTROL 2	rot			4 ml

Umrechnung: Kynurenin [ng/ml] x 4,8 = Kynurenin [nmol/l]

Inhalt: TRIS-Puffer mit quecksilberfreien Stabilisatoren, aufgestockt mit definierten Mengen Kynurenin.

### 4.3 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien

- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

### 4.4 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 – 300 µl
- 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
- Wärmeschrank (37 °C) oder ähnliche Heizvorrichtung

## 5. Probenbehandlung und Lagerung

Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben sollte vermieden werden! Es wird empfohlen, Blutproben am nüchternen Patienten zu entnehmen.

### Plasma

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

Hämolytische, ikterische und lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: Bis zu 48 Stunden (2 – 8 °C); bis zu 6 Monate (-15 bis -30 °C).

### Serum

Vollblut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation (nach Angaben des Herstellers) abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Proben von Patienten, die eine gerinnungshemmende Therapie erhalten, benötigen möglicherweise eine längere Gerinnungszeit.

Hämolytische, ikterische und lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: Bis zu 48 Stunden (2 – 8 °C); bis zu 6 Monate (-15 bis -30 °C).

## 6. Testdurchführung

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

Die Reaktion 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 der Reaktionsplatte 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 Hinweise

### Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC 50x** mit Wasser auf ein Endvolumen von 1.000 ml verdünnen.

Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

### Azylierungslösung

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

### Kynurenin Mikrotiterstreifen

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

## 6.2 Probenvorbereitung – Azylierung

1.	Jeweils <b>10 µl</b> der <b>Standards, Kontrollen</b> und <b>Proben</b> in die entsprechenden Wells der <b>REACT-PLATE 96</b> pipettieren.
2.	<b>250 µl</b> <b>ACYL-BUFF</b> in alle Wells pipettieren.
3.	<b>25 µl</b> <b>ACYL-REAG</b> in alle Wells pipettieren und für <b>1 min</b> bei <b>RT</b> (20 – 25 °C) auf einem <b>Schüttler</b> (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	Platte mit <b>FOIL</b> abdecken und für <b>90 min</b> bei <b>37 °C</b> inkubieren.
⚠	Jeweils <b>20 µl</b> der <b>azylierten Standards, Kontrollen</b> und <b>Proben</b> für den <b>Kynurenine ELISA</b> verwenden.

## 6.3 Kynurenine ELISA

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



## 7. Berechnung der Ergebnisse

<b>Messbereich</b>	63,3 – 10.000 ng/ml
--------------------	---------------------

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannt Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standardabsorptionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) mit einer Konzentration von 0,001 ng/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 des höchsten Standards (Standard F) liegen, entsprechen einer sehr hohen Konzentration des Analyten in der gemessenen Probe.*

Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen können direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards F gefunden werden, müssen mit dem inkludierten Standard A **STANDARD A** verdünnt und nochmal bestimmt werden.

### Umrechnung

Kynurenin (ng/ml) x 4,8 = Kynurenin (nmol/l)

### 7.1 Erwartete Referenzbereiche

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

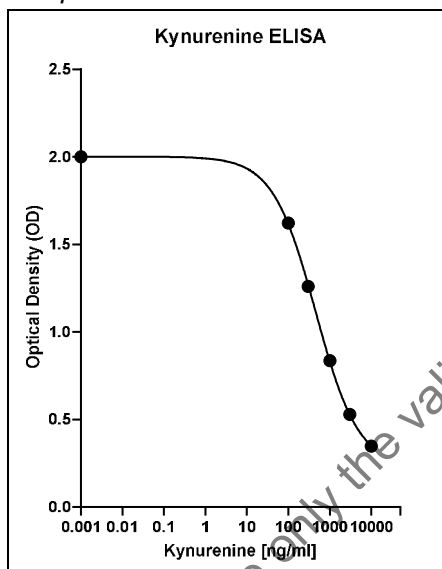
Der angegebene erwartete Referenzbereich basiert auf einer Methodenvergleichsstudie mit XLC-MS/MS [5].

<b>erwarteter Referenzbereich</b>	Serum/Plasma	237,4 – 754,2 ng/ml 1.140 – 3.620 nmol/l
-----------------------------------	--------------	---

Deutlich außerhalb des Referenzbereichs liegende Werte sollen ärztlich bewertet werden.

### 7.2 Typische Standardkurve

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



## 8. Kontrollproben

Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report angegeben.

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen Vorschriften zu verwenden. Verwenden Sie Kontrollen im normalen und pathologischen Bereich. Kontrollproben sollten innerhalb der festgelegten Vertrauensbereiche liegen.

## 9. Assaycharakteristika

### 9.1 Leistungsdaten

<b>Analytische Sensitivität</b>	
Limit of Blank (LOB)	32,2 ng/ml
Limit of Detection (LOD)	45,7 ng/ml
Limit of Quantification (LOQ)	63,3 ng/ml

<b>Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)</b>	
<b>Substanz</b>	<b>Kreuzreaktion [%]</b>
L-Kynurenin	100
5-Hydroxy-DL-Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Serotonin, L-Asparagin, Kynurensäure	0,05
Tryptophan	0,18
3-Hydroxy-DL-Kynurenin	0,3

<b>Präzision</b>							
<b>Intra-Assay</b>				<b>Inter-Assay</b>			
	Probe	Mittelwert ± SD [ng/ml]	CV [%]		Probe	Mittelwert ± SD [ng/ml]	CV [%]
Serum	1	389 ± 48,9	12,6	Serum	1	376 ± 67	17,7
	2	989 ± 108	11,0		2	889 ± 120	13,5
	3	2.324 ± 256	11,0		3	2.047 ± 203	14,8
Plasma	1	400 ± 61,8	15,5	Plasma	1	354 ± 45	12,6
	2	984 ± 120	12,2		2	867 ± 62	7,1
	3	2.230 ± 305	13,8		3	1.916 ± 168	8,8

<b>Lot-zu-Lot</b>			
	Probe	Mittelwert ± SD [ng/ml]	CV [%]
Kynurenin in künstlicher Matrix (n = 3)	1	591 ± 35,7	6,0
	2	1.655 ± 33,5	2,0
Kynurenin in Plasma (n = 3)	1	612 ± 33,9	5,5
	2	1.687 ± 54,7	3,2

<b>Wiederfindung</b>			
	Probe	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Serum	1	101	90 - 109
	2	93	90 - 96
	3	109	95 - 118
Plasma	1	96	82 - 106
	2	99	90 - 104
	3	103	97 - 110

<b>Linearität</b>			
	Serielle Verd. bis	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Serum	1:128	95	90 - 104
Plasma	1:128	94	89 - 102

<b>Methodenvergleich: ELISA gegen XLC-MS/MS</b>	XLC-MS/MS = 0,9x + 71,5; R <sup>2</sup> = 0,9355; n = 30

## 9.2 Metrologische Rückführbarkeit

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

<b>Standards und Kontrollen</b>	Unsicherheit [%]
	1,3

<b>Kynurenine ELISA</b>	Plasma	Konzentration [ng/ml]	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
		354	25,3
		867	14,4
<b>Kynurenine ELISA</b>	Serum	Konzentration [ng/ml]	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
		376	35,5
		889	27,1

\*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. Konishi, M., et al., *Impact of Plasma Kynurenine Level on Functional Capacity and Outcome in Heart Failure-Results From Studies Investigating Co-morbidities Aggravating Heart Failure (SICA-HF)*. Circ J, 2016. **81**(1): p. 52-61.
2. Li, H., et al., *Metabolomic adaptations and correlates of survival to immune checkpoint blockade*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4346.
3. 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.
4. Zinellu, A., et al., *Impact of cholesterol lowering treatment on plasma kynurenine and tryptophan concentrations in chronic kidney disease: relationship with oxidative stress improvement*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2015. **25**(2): p. 153-9.
5. 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.
6. Barone, P., *The 'Yin' and the 'Yang' of the kynurenine pathway: excitotoxicity and neuroprotection imbalance in stress-induced disorders*. Behav Pharmacol, 2019. **30**(2 and 3-Spec Issue): p. 163-186.
7. Keegan, M.R., et al., *Tryptophan metabolism and its relationship with central nervous system toxicity in people living with HIV switching from efavirenz to dolutegravir*. J Neurovirol, 2019. **25**(1): p. 85-90.
8. Kim, Y.K. and S.W. Jeon, *Neuroinflammation and the Immune-Kynurenine Pathway in Anxiety Disorders*. Curr Neuropharmacol, 2018. **16**(5): p. 574-582.
9. Lim, C.K., et al., *Involvement of the kynurenine pathway in the pathogenesis of Parkinson's disease*. Prog Neurobiol, 2017. **155**: p. 76-95.
10. 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.
11. Look, M.P., et al., *Parallel decrease in neurotoxin quinolinic acid and soluble tumor necrosis factor receptor p75 in serum during highly active antiretroviral therapy of HIV type 1 disease*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2000. **16**(13): p. 1215-21.
12. Labadie, B.W., R. Bao, and J.J. Luke, *Reimagining IDO Pathway Inhibition in Cancer Immunotherapy via Downstream Focus on the Tryptophan-Kynurenine-Aryl Hydrocarbon Axis*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(5): p. 1462-1471.
13. Bonaccorso, S., et al., *Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system*. J Clin Psychopharmacol, 2002. **22**(1): p. 86-90.
14. Bryleva, E.V. and L. Brundin, *Kynurenine pathway metabolites and suicidality*. Neuropharmacology, 2017. **112**(Pt B): p. 324-330.
15. Dornbierer, D.A., et al., *Nocturnal Gamma-Hydroxybutyrate Reduces Cortisol-Awakening Response and Morning Kynurenine Pathway Metabolites in Healthy Volunteers*. Int J Neuropsychopharmacol, 2019. **22**(10): p. 631-639.
16. Murakami, Y., et al., *Depressive symptoms as a side effect of Interferon-alpha therapy induced by induction of indoleamine 2,3-dioxygenase 1*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 29920.
17. Rudzki, L., et al., *Probiotic Lactobacillus Plantarum 299v decreases kynurenine concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind, randomized, placebo controlled study*. Psychoneuroendocrinology, 2019. **100**: p. 213-222.
18. Sorgdrager, F.J.H., et al., *Hydrocortisone Affects Fatigue and Physical Functioning Through Metabolism of Tryptophan: A Randomized Controlled Trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2018. **103**(9): p. 3411-3419.

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

## 11. Änderungen

Version	Freigabedatum	Kapitel	Änderung
17.0	2022-11-28	Alle	- Die IFU wurde gemäß der IVDR-Verordnung (EU) 2017-746 überarbeitet
		1	- Einleitung
		2.1	- Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen
		2.2.1	- Interferenzen
		3.	- Haltbarkeit nach Öffnen auf 2 Monate geändert
		4.1	- BA E-2212 Azylierungsreagenz Deckel weiß
		5.	- Probenbehandlung und Lagerung
		7.	- Berechnung der Ergebnisse präzisiert
		7.1	- Referenzbereich in nmol/l ergänzt
		7.2	- Typische Standardkurve aktualisiert
		9.1	- Lot-zu-Lot und LOB/LOQ zugefügt
		9.2	- Metrologische Rückführbarkeit zugefügt
		10.	- Referenzen aktualisiert
		11.	- Änderungen zugefügt

### Symbole:

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