

Instructions for use / Gebrauchsanweisung**Kynurenine ELISA**

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

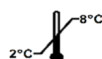
REF**BA E-2200****IVD**

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

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	13
4.	Materialien	13
4.1	Reagenzien im Kit	13
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.	Probensammlung, -behandlung und -lagerung	15
6.	Testdurchführung	15
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise	16
6.2	Probenvorbereitung – Azylierung	16
6.3	Kynurenine ELISA	16
7.	Berechnung der Ergebnisse	16
7.1	Erwartete Referenzbereiche	17
7.2	Typische Standardkurve	17
8.	Kontrollproben	17
9.	Assaycharakteristika	17
9.1	Leistungsdaten	17
9.2	Metrologische Rückführbarkeit	18
10.	Referenzen/Literatur	18
11.	Änderungen	19

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 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 acylated 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

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- γ [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].

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) 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.
- (16) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

- (17) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (18) 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.
- (19) 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

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 and food 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 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. 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	
Hazard pictograms:		
	GHS07	
Signal word:	Warning	
Hazardous ingredients:	2-methyl-2H-isothiazol-3-one	
Hazard statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.	
Precautionary statements:	P280 Wear protective gloves. P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water. 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-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-2210	AS KYN	Kynurenine Antiserum – ready to use
Content:	Rabbit anti-kynurenine 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-2211	ACYL-BUFF	Acylation Buffer – ready to use
Content:	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer	
Volume:	1 x 30 ml/vial, brown cap	
BA E-2212	ACYL-REAG	Acylation Reagent – ready to use
Content:	Acylation reagent in dimethylsulfoxide (DMSO)	
Volume:	1 x 3 ml/vial, white cap	
Hazard pictograms:		
	GHS07	
Signal word:	Warning	
Hazardous ingredients:	N'-(ethylcarbonimidoyl)-N,N-dimethylpropane-1,3-diamine monohydrochloride	
Hazard statements:	H317 May cause an allergic skin reaction. H412 Harmful to aquatic life with long lasting effects.	
Precautionary statements:	P280 Wear protective gloves. P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water. 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-2231	W KYN	Kynurenine Microtiter Strips – ready to use
Content:	1 x 96 wells (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] KYN	Concentration [nmol/l] KYN	Volume/ Vial
BA E-2201	STANDARD A	white	0	0	4 ml
BA E-2202	STANDARD B	yellow	100	480	4 ml
BA E-2203	STANDARD C	orange	300	1,440	4 ml
BA E-2204	STANDARD D	blue	1,000	4,800	4 ml
BA E-2205	STANDARD E	grey	3,000	14,400	4 ml
BA E-2206	STANDARD F	black	10,000	48,000	4 ml
BA E-2251	CONTROL 1	green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range.		4 ml
BA E-2252	CONTROL 2	red			4 ml

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

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

4.3 Additional materials required but not provided in the kit

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

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, handling 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 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

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

6.3 Kynurenine ELISA

1.	Pipette 20 µl of the acylated standards, controls and samples into the appropriate wells of the U KYN .
2.	Add 50 µl of the AS KYN 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 foil. Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 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 each well.
6.	Incubate 30 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
7.	Discard or aspirate the contents of the wells. Wash the plate 4 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 each well and incubate for 20 – 30 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). Avoid exposure to direct sunlight!
9.	Pipette 100 µl of the STOP-SOLN into each well and shake the microtiter plate shortly.
10.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 min, using a microtiter plate reader set to 450 nm (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

7. Calculation of results

Measuring range	Kynurenine
	63.3 – 10,000 ng/ml

The standard curve, 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 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 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 Standard A and must be re-assayed. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

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 values.

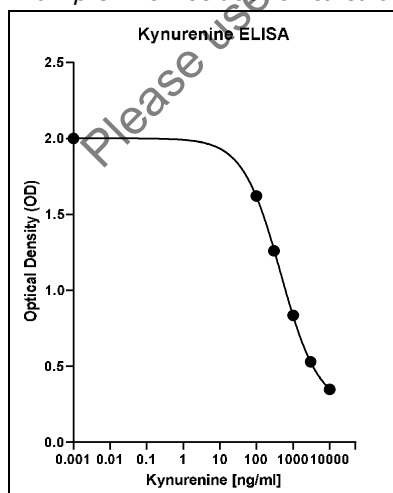
The expected reference values indicated below are based on method comparison studies to XLC-MS/MS [5].

Expected reference value	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. 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)	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 ± 66.5	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 ± 44.6	12.6
	2	984 ± 120	12.2		2	867 ± 61.7	7.1
	3	2,230 ± 305	13.8		3	1,916 ± 168	8.8

Lot-to-Lot			
	Sample	Mean ± SD [ng/ml]	CV [%]
Kynurenine in artificial matrix (n = 4)	1	523 ± 37.6	7.2
	2	1,598 ± 127	8.0
Kynurenine in plasma (n = 4)	1	449 ± 21.8	4.9
	2	1,411 ± 211	15.0

Recovery			
	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

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

Method comparison: ELISA vs. XLC-MS/MS	XLC-MS/MS = 0.9x + 71.5; R ² = 0.9355; n = 30
---	--

9.2 Metrological Traceability

The values assigned to the standards and controls of the Kynurenine ELISA are traceable to SI Units by weighing with quality-controlled analyte.

Standards and Controls	Uncertainty [%]
	2.3

Kynurenine ELISA		
plasma	concentration [ng/ml]	Expanded Uncertainty [%] k = 2*
	354	25.6
	867	14.9
serum	concentration [ng/ml]	Expanded Uncertainty [%] k = 2*
	376	35.7
	889	27.4

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

10. References/Literature

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.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 1. 2.1 2.2.1 3. 4.1 5. 7. 7.1 7.2 9.1 9.2 10. 11.	- The IFU was revised according to the IVDR regulation (EU) 2017/746 - Introduction - Procedural notes, guidelines and warnings - Interfering substances - Shelf life after opening changed to 2 months - BA E-2212 Acylation Reagent now with white cap - Sample collection and storage - Calculation of results clarified - Reference range in nmol/l added - Typical standard curve updated - Lot-to-Lot and LOB/LOQ added - Metrological traceability added - References updated - Changes added
18.0	2024-02-15	4.1 9.1	- Hazard labelling updated according to SDS - Lot-to-Lot updated
19.0	2024-09-26	7 9.2	- Note added to the dilution factor in the calculation - Metrological traceability updated
20.0	2025-04-10	2.1 4.1	- Updated - 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		Do not re-use		

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 anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an die feste Phase der Mikrotiterplatte gebunden. Die Analytkonzentrationen der azylierten 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 unbekannten 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

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- γ [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].

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) In der 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) 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.
- (16) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potentiell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
- (17) Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (18) 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.
- (19) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.

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 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. 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	
Gefahren- piktogramme:		
	GHS07	
Signalwort:	Achtung	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	2-Methyl-2H-isothiazol-3-on	
Gefahren- hinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.	
Sicherheits- hinweise:	P280 Schutzhandschuhe tragen. P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
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-2210	AS KYN	Kynurenin Antiserum – gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen anti-Kynurenin Antikörper im Proteinpuffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel, blau gefärbt	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau	
Beschreibung:	Spezies des Antikörpers ist Kaninchen; Spezies des Proteins im Puffer ist Rind	
BA E-2211	ACYL-BUFF	Azylierungspuffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) Puffer	
Volumen:	1 x 30 ml/Fläschchen, Deckel braun	
BA E-2212	ACYL-REAG	Azylierungsreagenz – gebrauchsfertig
Inhalt:	Azylierungsmittel in Dimethylsulfoxid (DMSO)	
Volumen:	1 x 3 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
Gefahren- piktogramme:		
	GHS07	
Signalwort:	Achtung	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid	
Gefahren- hinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.	
Sicherheits- hinweise:	P280 Schutzhandschuhe tragen. P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
BA E-2231	W KYN	Kynurenin Mikrotiterstreifen – 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

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration [ng/ml] KYN	Konzentration [nmol/l] KYN	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. Probensammlung, -behandlung 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. 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 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 weitere Hinweise

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC** **50x** mit Wasser auf ein Endvolumen von 1000 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 Stabilisierlösung 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 10 µl der Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells der REAC-PLATE pipettieren.
2.	250 µl ACYL-BUFF in alle Wells pipettieren.
3.	25 µl ACYL-REAG in alle Wells pipettieren und für 1 min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	Platte mit FOILS abdecken und für 90 min bei 37 °C inkubieren.
!	Jeweils 20 µl der azylierten Standards, Kontrollen und Proben für den Kynurenine ELISA verwenden.

6.3 Kynurenine ELISA

1.	20 µl der azylierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells der KYN pipettieren.
2.	50 µl AS KYN 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 4-mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5.	100 µl CONJUGATE in alle 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 4-mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8.	100 µl SUBSTRATE in alle 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	Kynurenine
	63,3 – 10.000 ng/ml

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannten 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 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 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 Standard A verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

Umrechnung

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

7.1 Erwartete Referenzbereiche

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

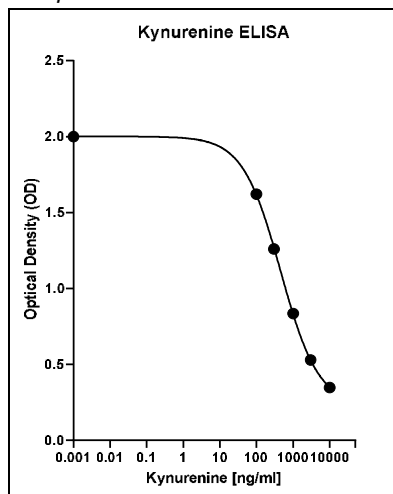
Der angegebene erwartete Referenzbereich basiert auf einer Methodenvergleichsstudie mit XLC-MS/MS [5].

Erwarteter Referenzbereich	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

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen Vorschriften zu verwenden. Verwenden Sie Kontrollen im normalen und pathologischen Bereich. Kommerzielle Kontrollproben müssen dabei wie die unbekannten 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)	32,2 ng/ml
Limit of Detection (LOD)	45,7 ng/ml
Limit of Quantification (LOQ)	63,3 ng/ml

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

Präzision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Probe	Mittelwert ± SD [ng/ml]	CV [%]		Probe	Mittelwert ± SD [ng/ml]	CV [%]
Serum	1	389 ± 48,9	12,6	Serum	1	376 ± 66,5	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 ± 44,6	12,6
	2	984 ± 120	12,2		2	867 ± 61,7	7,1
	3	2.230 ± 305	13,8		3	1.916 ± 168	8,8

Lot-zu-Lot			
	Probe	Mittelwert ± SD [ng/ml]	CV [%]
Kynurenin in künstlicher Matrix (n = 4)	1	523 ± 37,6	7,2
	2	1.598 ± 127	8,0
Kynurenin in Plasma (n = 4)	1	449 ± 21,8	4,9
	2	1.411 ± 211	15,0

Wiederfindung			
	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

Linearität			
	Serielle Verd. bis	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Serum	1:128	95	90 – 104
Plasma	1:128	94	89 – 102

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

9.2 Metrologische Rückführbarkeit

Die den Standards und Kontrollen des Kynurenine ELISA zugewiesenen Werte sind durch Wägung mit qualitätskontrollierten Analyten auf SI-Einheiten rückführbar.

Standards und Kontrollen	Unsicherheit [%]
	2,3

Kynurenine ELISA		
Plasma	Konzentration [ng/ml]	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
	354	25,6
	867	14,9
Serum	Konzentration [ng/ml]	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
	376	35,7
	889	27,4

* 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 Neuropsychopharmacol, 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.

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 1 2.1 2.2.1 3. 4.1 5. 7. 7.1 7.2 9.1 9.2 10. 11.	- Die IFU wurde gemäß der IVDR-Verordnung (EU) 2017-746 überarbeitet - Einleitung - Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen - Interferenzen - Haltbarkeit nach Öffnen auf 2 Monate geändert - BA E-2212 Azylierungsreagenz Deckel weiß - Probenbehandlung und Lagerung - Berechnung der Ergebnisse präzisiert - Referenzbereich in nmol/l ergänzt - Typische Standardkurve aktualisiert - Lot-zu-Lot und LOB/LOQ zugefügt - Metrologische Rückführbarkeit zugefügt - Referenzen aktualisiert - Änderungen zugefügt
18.0	2024-02-15	4.1 9.1	- Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert - Lot-zu-Lot aktualisiert
19.0	2024-09-26	7 9.2	- Anmerkung zum Verdünnungsfaktor bei der Berechnung hinzugefügt - Metrologische Rückführbarkeit aktualisiert
20.0	2025-04-10	2.1 4.1	- Aktualisiert - Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert

Symbole:

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