



LDN Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG

Am Eichenhain 1, 48531 Nordhorn

Telefon: +49-5921-8197 0

Telefax: +49-5921-8197 222

e-mail: info@ldn.de

Internet: <http://www.ldn.de>

LDN[®]

Instructions for use
Tryptophan ELISA

REF

BA E-2700



IVD



1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Tryptophan in urine, serum and plasma samples.

After extraction and derivatization Tryptophan is quantitatively determined by ELISA.

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

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a standard curve prepared with known standards.

1.2 Clinical application

L-Tryptophan is one of the essential amino acids for the human metabolism and must be part of its diet.

In humans it serves as precursor for the synthesis of the neurotransmitters serotonin and tryptamine as well as for the synthesis of nicotinic acid and the epiphyseal hormone melatonin. Tryptophan is catabolized to kynurenine through the enzyme IDO (indoleamine-2,3-dioxygenase). Increased IDO activity is an expression of neuro-endocrine-immunological dysregulation, which is often associated with depressive symptoms such as bipolar disorder (manic depression). In addition Tryptophan and its metabolites regulate neurobehavioral effects such as appetite, sleeping-waking-rhythm and pain perception.

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as under point "Procedural cautions, guidelines and warnings". 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.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any 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 has to be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for certain types of samples 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) Reagents of this kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- (4) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (5) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled or ultra-pure water.
- (8) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided.
- (9) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (10) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.
- (11) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (12) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (13) A standard curve must be established for each run.
- (14) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report.

- (15) 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.
- (16) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (17) Some reagents contain sodium azide (NaN₃) as preservatives. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water. NaN₃ may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. When disposing reagents, flush with a large volume of water to avoid azide build-up.
- (18) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them.
- (19) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheet (MSDS). The Material Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (20) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (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.
- (22) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

2.2 Limitations

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

2.2.1 Interfering substances

Serum/Plasma

Samples containing precipitates or fibrin strands or which are haemolytic or lipemic might cause inaccurate results.

24-hour urine

Please note the sample preparation! If the percentage of the final concentration of acid is too high, the buffer capacity of the Diluent is insufficient. As a consequence tryptophan will not be extracted quantitatively.

2.2.2 Drug interferences

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

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

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

4. Materials

4.1 Contents of the kit

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Ready to use
Contents:	Adhesive Foils in a resealable pouch	
Volume:	1 x 4 foils	
BA D-0024	REAC-PLATE	Reaction Plate - Ready to use
Contents:	1 x 96 well plate, empty in a resealable pouch	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate - Concentrated 50x
Contents:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, light purple cap	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate - Ready to use
Contents:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	

- BA E-0055** **SUBSTRATE** **Substrate** - Ready to use
 Contents: Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide
 Volume: 1 x 12 ml/black vial, black cap
- BA E-0080** **STOP-SOLN** **Stop Solution** - Ready to use
 Contents: 0.25 M sulfuric acid
 Volume: 1 x 12 ml/vial, light grey cap
- BA E-2731** **TRYP** **Tryptophan Microtiter Strips** - Ready to use
 Contents: 1 x 96 well (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant
- BA E-2710** **AS TRYP** **Tryptophan Antiserum** - Ready to use
 Contents: Rabbit anti-tryptophan antibody, blue coloured
 Volume: 1 x 6 ml/vial, blue cap

Standards and Controls - Ready to use

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

Conversion: Tryptophan (µg/ml) x 4.89 = Tryptophan (µmol/l)

Contents: Acidic buffer with non-mercury stabilizer, spiked with defined quantity of tryptophan

- BA E-2413** **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** - Ready to use
 Contents: Buffer with alkaline pH
 Volume: 1 x 20 ml/vial, yellow cap
- BA E-2428** **EQUA-REAG** **Equalizing Reagent** - Lyophilized
 Contents: Lyophilized protein
 Volume: 1 vial, brown cap
- BA E-2458** **Q-BUFFER** **Q-Buffer** - Ready to use
 Contents: TRIS buffer
 Volume: 1 x 20 ml/vial, white cap
- BA E-2788** **PBS** **PBS** - Ready to use
 Contents: Phosphate Buffered Saline
 Volume: 1 x 20 ml/vial, orange cap
- BA E-2446** **D-REAGENT** **D-Reagent** - Ready to use
 Contents: Crosslinking agent in dimethylsulfoxide
 Volume: 1 x 4 ml/vial, white cap

Hazards identification:



H318 Causes serious eye damage.
 H334 May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.
 H332 Harmful if inhaled.
 H315 Causes skin irritation.
 H317 May cause an allergic skin reaction.

BA E-2721**PREC-REAG****Precipitating Reagent - Ready to use**

Contents: Acidic reagent for precipitation of plasma/serum proteins, red coloured

Volume: 1 x 4 ml/vial, white cap

Hazards
identification:



H302 Harmful if swallowed.

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

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 – 300 µl; 12.5 ml
- Polystyrene or polypropylene tubes and suitable rack
- 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)
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled or ultra-pure)
- Vortex mixer

5. Sample collection and storage**Plasma**

Whole blood should be collected by venipuncture into centrifuge tubes containing EDTA as anti-coagulant (Monovette™ or Vacuette™ for plasma) and centrifuged at room temperature immediately after collection.

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

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

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

Repeated freezing and thawing should be avoided.

Serum

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

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

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

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

Repeated freezing and thawing should be avoided.

Urine

Spontaneous urine or 24-hour urine, collected in a bottle containing 10 - 15 ml of 6 M HCl, can be used.

If 24-hour urine is used please record the total volume of the collected urine. If the percentage of the final concentration of acid is too high, the buffer capacity of the Diluent is insufficient. As a consequence tryptophan will not be extracted quantitatively.

Storage: for longer periods (up to 6 month) at -20 °C.

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

6. Test procedure

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Duplicate determinations are recommended.

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent, and the absorbance values may vary if a thermostat is not used. The higher the temperature, the higher the extinction values will be. Corresponding variations also apply to the incubation times. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20 – 25 °C.



In case of overflow, read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 405 nm

6.1 Preparation of reagents**Wash Buffer**

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

Storage: 1 month at 2 – 8 °C

Equalizing Reagent

Reconstitute the Equalizing Reagent with **12.5 ml** of **Assay Buffer**.

Reconstituted Equalizing Reagent which is not used immediately has to be stored in aliquots for max 1 month at -20 °C and may be thawed only once.

D-Reagent

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

6.2 Precipitation

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

6.3 Derivatization

1.	Pipette 25 µl of the precipitated standards, controls and samples into the appropriate wells of the Reaction Plate .
2.	Pipette 50 µl of the Equalizing Reagent into all wells.
3.	Pipette 10 µl of the D-Reagent into all wells.
4.	Cover plate with Adhesive Foil and incubate for 2 h at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
5.	Pipette 100 µl of the Q-Buffer into all wells.
6.	Incubate for 10 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
7.	Use 25 µl for the ELISA!

6.4 Tryptophan ELISA

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

7. Calculation of results

Measuring range	Tryptophan
	1.2 - 250 µg/ml

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

Use non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).
The concentrations of the samples and controls can be read directly from the standard curve.
The total amount of Tryptophan excreted in urine during 24 h is calculated as following:
 $\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$

Conversion

Tryptophan ($\mu\text{g}/\text{ml}$) $\times$ 4.89 = Tryptophan ($\mu\text{mol}/\text{l}$)

Expected reference values

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

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the Tryptophan ELISA the following values are observed:

Plasma / Serum	Spontaneous urine
9.3 – 17 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.5 – 40 $\mu\text{g}/\text{g}$ creatinine

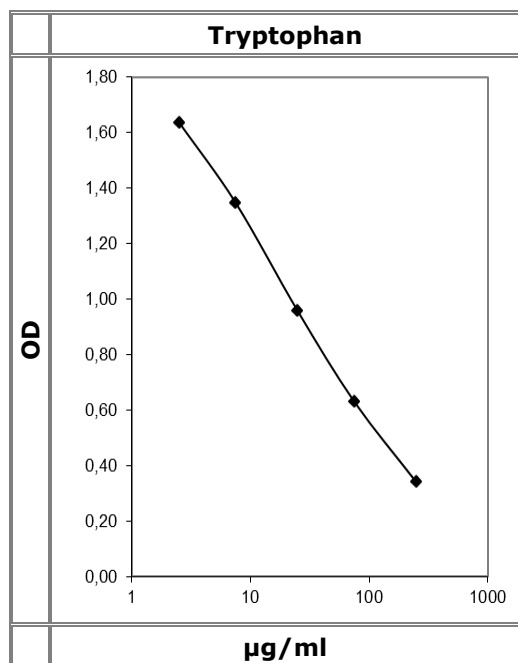
7.1 Quality control

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. The kit controls or other commercial controls should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC-Report.

7.2 Typical standard curve



Example, do not use for calculation!



8. Assay characteristics

Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	Tryptophan	
	1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)
	Tryptophan	100
	5-Hydroxy-L-tryptophan	<0.01
	Tryptamine	<0.01
	5-Methoxy-L-tryptophan	<0.01
	5-Hydroxytryptamine	<0.01
	5-Methoxytryptamine	<0.01

Precision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample	Range (µg/ml)	CV (%)	Sample	Range (µg/ml)	CV (%)
1 (n = 77)	9.4 ± 1.0	11	1 (n = 16)	9.2 ± 1.4	15
2 (n = 78)	27 ± 2.8	11	2 (n = 16)	45 ± 4	8.4

Linearity		Range (µg/ml)	Serial dilution up to	Range (%)
	Urine	1.3 - 100	1:75	101 - 129

Recovery		Mean (%)	Range (%)
	Urine	106	104 - 110
	Serum	95	86 - 100

9. References/Literature

- (1) El-Bakly et al. Hypericum Perforatum Decreased Hippocampus TNF-α and Corticosterone Levels with No Effect on Kynurenine/Tryptophan Ratio in Bilateral Ovariectomized Rats. Korean J Physiol Pharmacol, 18:133-139 (2014)
- (2) Nowak et al. Tryptophan hydroxylase-1 regulates immune tolerance and inflammation. The Journal of Experimental Medicine, 209(11): 2127-2135 (2012)
- (3) Sorensen et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase specific, cytotoxic T cells as immune regulators. Blood, 117(7): 2200-2210 (2011)

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

Symbols:

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

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Tryptophan in Urin-, Serum- und Plasmaproben.

Tryptophan wird extrahiert und derivatisiert und anschließend quantitativ im ELISA bestimmt.

Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an eine feste Phase gebunden. Die Analyte in den Standards, Kontrollen und Proben und die an die feste Phase gebundenen Analyte 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 die feste 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 in den Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt.

1.2 Klinische Anwendung

Die Aminosäure L-Tryptophan ist für den Menschen essentiell und wird über die Nahrung aufgenommen. Tryptophan dient als Vorstufe bei der Synthese der Neurotransmitter Serotonin und Tryptamin, der Nikotinsäure und des Epiphysenhormons Melatonin. Das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) verwandelt Tryptophan in Kynurenin um. Eine erhöhte IDO-Aktivität ist ein Zeichen einer neuroendokrinen-immunologischen Dysregulation im Menschen, die oft mit depressiven Symptomen wie z.B. einer bipolaren Störung (manische Depression) beschrieben wird. Des Weiteren reguliert Tryptophan und dessen Stoffwechselprodukte neurologische Verhaltensweisen wie den Appetit, den Schlaf-Wach-Rhythmus und die Schmerzempfindung.

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.

Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

- (1) Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter *Verwendungszweck* (siehe Kapitel 1) angegebenen Probenarten validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die humanes Serum oder Plasma enthaltenden Reagenzien des Kits wurden mit geprüften Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Dennoch sollten sämtliche Reagenzien bei der Handhabung und Entsorgung als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandelt werden.
- (4) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (5) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.
- (8) Die Mikrotiterplatte verfügt über abbrechbare Streifen. Ungenutzte Kavitäten müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
- (9) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (10) 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.
- (11) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Kavitäten sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.

- (12) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (13) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (14) 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.
- (15) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (16) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (17) Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (NaN₃) als Konservierungsmittel. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen. NaN₃ kann mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung der Reagenzien mit reichlich Wasser spülen, um die Ansammlung von Azid zu vermeiden.
- (18) 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.
- (19) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe Sicherheitsdatenblatt (MSDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (20) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.
- (21) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.
- (22) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

2.2 Grenzen des Tests

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

2.2.1 Interferenzen

Serum/Plasma

Proben, die ein Präzipitat oder die Fibrinfäden enthalten oder die hämolytisch oder lipämisch sind, können zu ungenauen Ergebnissen führen.

Sammelurin

Probenvorbereitung beachten! Ist der Säuregehalt des 24 Stunden-Sammelurins zu hoch, reicht die Pufferkapazität des Diluent nicht aus. In der Folge wird Tryptophan nicht mehr ausreichend extrahiert.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

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

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

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

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA D-0090

FOILS

Adhesive Foil - Gebrauchsfertig

Inhalt:

4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel

Volumen:

1 x 4 Folien

BA D-0024

REAC-PLATE

Reaction Plate - Gebrauchsfertig

Inhalt:

1 x 96 Well Platte, leer in einem wiederverschließbaren Beutel

BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate - 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege Anti-Kaninchen Immunglobulin konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel rot	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrate mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/ Fläschchen schwarz, Deckel schwarz	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution - Gebrauchsfertig
Inhalt:	0.25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel hellgrau	
BA E-2731	TRYP	Tryptophan Microtiter Strips - Gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem widerverschließbaren Folienbeutel	
BA E-2710	AS TRYP	Tryptophan Antiserum - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen Anti- Tryptophan Antikörper, blau gefärbt	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau	

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration µg/ml	Konzentration µmol/l	Volumen/ Fläschchen
BA E-2701	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA E-2702	STANDARD B	hellgelb	2,5	12,2	4 ml
BA E-2703	STANDARD C	orange	7,5	36,7	4 ml
BA E-2704	STANDARD D	dunkelblau	25	122	4 ml
BA E-2705	STANDARD E	hellgrau	75	367	4 ml
BA E-2706	STANDARD F	schwarz	250	1224	4 ml
BA E-2751	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben		4 ml
BA E-2752	CONTROL 2	dunkelrot			4 ml

Umrechnung: Tryptophan (µg/ml) x 4,89 = Tryptophan (µmol/l)

Inhalt: Saurer Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel, aufgestockt mit einer definierten Menge Tryptophan

BA E-2413	ASSAY-BUFF	Assay Buffer - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Puffer mit alkalischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/ Fläschchen, Deckel gelb	
BA E-2428	EQUA-REAG	Equalizing Reagent - Lyophilisat
Inhalt:	Lyophilisiertes Protein	
Volumen:	1 Fläschchen, Deckel braun	
BA E-2458	Q-BUFFER	Q-Buffer - Gebrauchsfertig
Inhalt:	TRIS Puffer	
Volumen:	1 x 20 ml/ Fläschchen, Deckel weiß	
BA E-2788	PBS	PBS - Gebrauchsfertig
Inhalt:	Phosphatgepufferte Salzlösung	
Volumen:	1 x 20 ml/ Fläschchen, Deckel orange	

BA E-2446**D-REAGENT****D-Reagent** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Crosslinker in Dimethylsulfoxid
 Volumen: 1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel weiß
 Mögliche Gefahren:



H318 Verursacht schwere Augenschäden.
 H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
 H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
 H315 Verursacht Hautreizungen.
 H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

BA E-2721**PREC-REAG****Precipitating Reagent** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Saures Reagenz zur Präzipitierung der Plasma-/Serumproteine, rot gefärbt
 Volumen: 1 x 4 ml/ Fläschchen, Deckel weiß
 Mögliche Gefahren:



H302 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

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

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 – 300 µl; 12,5 ml
- Polystyrol-Röhrchen mit passendem Ständer
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 - 650 nm-Filter
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Vortex-Mischer
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

5. Probenmaterial und Lagerung**Plasma**

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

Es wird dazu geraten, Blutproben im nüchternen Zustand - bei Kindern 2 -3 Stunden nach der letzten Mahlzeit - zu verwenden. Hämolytische und insbesondere lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

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

Serum

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

Es wird dazu geraten, Blutproben im nüchternen Zustand - bei Kindern 2 -3 Stunden nach der letzten Mahlzeit - zu verwenden. Hämolytische und insbesondere lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

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

Urin

Es kann Spontanurin oder 24 Stunden-Sammelurin verwendet werden (im Sammelbehälter werden zur Stabilisierung des Sammelurins 10 - 15 ml 6 M HCl vorgelegt). *Wird 24 Stunden Sammelurin verwendet, ist es notwendig, das Volumen zu bestimmen und für die spätere Auswertung der Ergebnisse zu notieren.* Ist der Säuregehalt des 24 Stunden-Sammelurins zu hoch, reicht die Pufferkapazität des Diluent nicht aus. In der Folge wird Tryptophan nicht mehr quantitativ extrahiert.

Lagerung: für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Direktes Sonnenlicht vermeiden!

6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt werden. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.

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

⚠ *Liegt die gemessene Extinktion außerhalb des Messbereichs, so muss diese innerhalb von 10 Minuten bei 405 nm gemessen werden.*

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer

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

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 °C

Ausgleichsreagenz

Den Inhalt eines Fläschchen **EQUA-REAG** (BA E-2428) mit **12,5 ml ASSAY-BUFF** (BA E-2413) lösen. Rekonstituiertes Ausgleichsreagenz, welches nicht benötigt wird, sollte umgehend aliquotiert und für max. 1 Monat bei -20 °C gelagert werden (nur einmal auftauen).

D-Reagent **D-REAGENT**

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

6.2 Präzipitation

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

6.3 Derivatisierung

1.	Jeweils 25 µl der präzipitierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Kavitäten der REAC-PLATE pipettieren.
2.	Jeweils 50 µl Ausgleichsreagenz (siehe 6.1) in alle Kavitäten pipettieren.
3.	Jeweils 10 µl D-REAGENT in alle Kavitäten pipettieren.
4.	Platte mit FOIL abdecken und 2 Stunden bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
5.	Jeweils 100 µl Q-BUFFER in alle Kavitäten pipettieren.
6.	Für 10 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
7.	Jeweils 25 µl für den ELISA verwenden!

6.4 Tryptophan ELISA

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

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Tryptophan
	1,2 - 250 µg/ml

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannten Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Extinktionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) erstellt. Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) verwendet.

Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen können direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Die Tagesmenge Tryptophan, die innerhalb von 24 Stunden im Urin ausgeschieden wird, errechnet sich wie folgt:

$$\mu\text{g}/24 \text{ Stunden} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24 \text{ Stunden}$$

Umrechnung

$$\text{Tryptophan } (\mu\text{g/ml}) \times 4,89 = \text{Tryptophan } (\mu\text{mol/l})$$

Erwartete Referenzwerte

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

In einer Studie wurden Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem Tryptophan ELISA folgende Werte:

Plasma / Serum	Spontanurin
9,3 - 17 µg/ml	1,5 - 40 µg/g Kreatinin

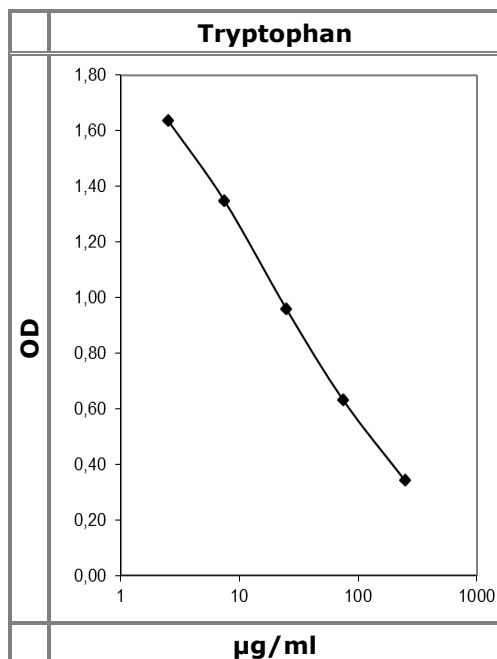
7.1 Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie die Kitkontrollen und/oder andere kommerzielle Kontrollproben im physiologischen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Die Kontrollproben müssen dabei innerhalb der angegebenen Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

7.2 Typische Standardkurve



Beispiel: bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8. Testcharakteristika

Sensitivität (Limit of Detection)	Tryptophan
	1,2 µg/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktion)	Substanz	Kreuzreaktion (%)
	Tryptophan	100
	5-Hydroxy-L-tryptophan	<0,01
	Tryptamin	<0,01
	5-Methoxy-L-tryptophan	<0,01
	5-Hydroxytryptamin	<0,01
	5-Methoxytryptamine	<0,01

Präzision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Probe	Bereich (µg/ml)	CV (%)	Probe	Bereich (µg/ml)	CV (%)
1 (n = 77)	9,4 ± 1,0	11	1 (n = 16)	9,2 ± 1,4	15
2 (n = 78)	27 ± 2,8	11	2 (n = 16)	45 ± 4	8,4

Linearität		Bereich (µg/ml)	Serielle Verdünnung bis	Bereich (%)
	Urine	1,3 - 100	1:75	101 - 129

Wiederfindung		Mittelwert (%)	Bereich (%)
	Urin	106	104 - 110
	Serum	95	86 - 100

9. Referenzen/Literatur

- (1) El-Bakly et al. Hypericum Perforatum Decreased Hippocampus TNF-α and Corticosterone Levels with No Effect on Kynurenine/Tryptophan Ratio in Bilateral Ovariectomized Rats. Korean J Physiol Pharmacol, 18:133-139 (2014)
- (2) Nowak et al. Tryptophan hydroxylase-1 regulates immune tolerance and inflammation. The Journal of Experimental Medicine, 209(11): 2127-2135 (2012)
- (3) Sorensen et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase specific, cytotoxic T cells as immune regulators. Blood, 117(7): 2200-2210 (2011)

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

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Tests
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen		Inhalt		CE gekennzeichnet
	Achtung		Katalog-Nummer		Nur für Forschungszwecke