LDN®
IMMUNOASSAYS AND SERVICES
BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY
LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co. KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

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

Instructions for use / Gebrauchsanweisung

GABA ELISA

REF **BA E-2500**

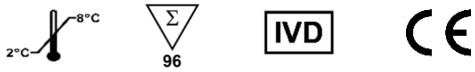


Table of contents

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

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

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	13
1.1	Verwendungszweck und Testprinzip	13
1.2	Klinische Anwendung	13
2.	Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen	13
2.1	Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen	13
2.2	Grenzen des Tests	14
2.2.1	Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben	14
2.2.2	Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel	14
2.2.3	High-Dose-Hook Effekt	14
3.	Lagerung und Haltbarkeit	14
4.	Materialien	14
4.1	Reagenzien im Kit	14
4.2	Kalibratoren und Kontrollen	17
4.3	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien	17
4.4	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte	17
5.	Probensammlung, -behandlung und -lagerung	17
6.	Testdurchführung	17
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise	17
6.2	Probenvorbereitung – Extraktion	18
6.3	Derivatisierung	18
6.4	GABA ELISA	18
7.	Berechnung der Ergebnisse	19
7.1	Erwartete Referenzbereiche	19
7.2	Typische Standardkurve	19
8.	Kontrollproben	19
9.	Assaycharakteristika	20
9.1	Leistungsdaten	20
9.2	Metrologische Rückführbarkeit	21
10.	Referenzen/Literatur	21
11.	Änderungen	21

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

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of gamma-aminobutyric acid (GABA) in urine, to evaluate GABA homeostasis. The determination of gamma-aminobutyric acid (GABA) in urine is helpful for the determination of neurostress.
After extraction and derivatization gamma-aminobutyric acid (GABA) is quantitatively determined by ELISA.
The subsequent competitive ELISA uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The derivatized analyte concentrations of the standards, controls and samples compete with the solid phase bound analytes 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

GABA (γ-aminobutyric acid) is one of the most important inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS). GABA operates through interneurones by the inhibition of the release of excitatory neurotransmitters. In the CNS GABA is synthesized from L-glutamic acid which is an excitatory neurotransmitter.
Many publications postulate, that the determination of GABA in urine is helpful for the determination of neurostress. The collective term „neurostress" refers to many physical and psychological complaints caused due to our modern way of life, unfavourable environmental conditions, poor diet, medications, occupational and social stress, sleep deprevation, overstimulation or genetic predisposition. The resulting symptoms are burnout, depression, insomnia, chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, multiple chemical sensitivity and other chronic pathologies. Furthermore, many publications describe an impaired or dysregulated glutamic acid balance in relation to previously listed symptoms. Based on this some laboratories offer the determination of specific neurostress profiles including, among others, the determination of GABA. In this case, GABA is detected primarily in the second morning urine by several methods. To generate a profound neurostress profile, also other analytes (glutamate, serotonin, norepinephrine, dopamine, epinephrine, melatonin, DHEA and cortisol) should be determined.
Determined GABA-levels beyond the reference value should be discussed and clarified with a therapist or an attending physician.
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) Standards, Controls and specimen samples should be assayed in duplicate.
(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.

Please use only the valid version of the Instructions for Use 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

Urine

Please note the sample handling! It cannot be excluded that high acid concentrations lead to incorrect results. Up to 20 µl 6 M HCl per 1 ml urine no influence on the results was observed.

2.2.2 Drug and food interferences

It is recommended to forgo food supplements which might influence GABA levels (lemon balm, velerian, vitamin B6, L-theanine and kava) 24 hours before urine sampling.
Furthermore, additional diets before urine sampling are not described in the literature.
In case of unusual GABA levels it is recommended to check if these are caused by interaction of the above listed substances.

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. Reconstituted Equalizing Reagent which is not used immediately has to be stored in aliquots for max. 2 months at < -15 °C and may be thawed only once. 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-0033	**MTP** **48**	**Macrotiter Plate** – ready to use
Content:	2 x 48 well plate, empty, in a resealable pouch	
BA D-0090	**FOILS**	**Adhesive Foil** – ready to use
Content:	Adhesive foils in a resealable pouch	
Number:	3 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.	

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

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-2413	**ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** – ready to use
Content:	Buffer with alkaline pH
Volume:	1 x 20 ml/vial, yellow cap
Hazard pictograms:	 GHS08 GHS07
Signal word:	Danger
Hazardous ingredients:	Boric acid
Hazard statements:	H360FD May damage fertility. Suspected of damaging the unborn child.
Precautionary statements:	P201 Obtain special instructions before use. P280 Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection. P308+P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.
Additional statements:	Restricted to professional users.
BA E-2428	**EQUA-REAG** **Equalizing Reagent** – lyophilized
Content:	Lyophilized protein
Volume:	1 vial, brown cap
Description:	Species is bovine
BA E-2442	**EXTRACT-PLATE 48** **Extraction Plate** – ready to use
Content:	2 x 48 well plate, precoated with cation exchanger in a resealable pouch
BA E-2446	**D-REAGENT** **D-Reagent** – ready to use
Content:	Crosslinking agent in dimethylsulfoxide
Volume:	1 x 3 ml/vial, white cap
Hazard pictograms:	 GHS07
Signal word:	Warning
Hazardous ingredients:	Glutaraldehyde
Hazard statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.
Precautionary statements:	P261 Avoid breathing mist/vapours/spray. P280 Wear protective gloves. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.
BA E-2458	**Q-BUFFER** **Q-Buffer** – ready to use
Content:	TRIS buffer
Volume:	1 x 20 ml/vial, white cap

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

BA E-2510	AS GABA	**GABA Antiserum** – ready to use
Content:	Rabbit anti-GABA 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-2531	MTP GABA	**GABA Microtiter Strips** – ready to use
Content:	1 x 96 wells (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable foil pouch with desiccant	
BA E-2541	ELUTION-BUFF	**Elution Buffer** – ready to use
Content:	Buffer with citric acid	
Volume:	1 x 20 ml/vial, green cap	
BA E-2560	DILUENT	**Diluent** – ready to use
Content:	Buffer with acidic pH	
Volume:	2 x 20 ml/vial, blue cap	
Hazard pictograms:	GHS07	
Signal word:	Warning	
BA E-2561	I-BUFFER	**I-Buffer** – concentrated
Content:	Buffer with non-ionic detergent and non-mercury preservative	
Volume:	1 x 4 ml/vial, red cap	
BA E-2787	NAOH	**NaOH** – ready to use
Content:	Sodium hydroxide solution	
Volume:	1 x 2 ml/vial, purple cap	
Hazard pictograms:	GHS07	
Signal word:	Warning	

4.2 Calibration and Controls

Standards and Controls – ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration [ng/ml]	Concentration [nmol/l]	Volume/ Vial
BA E-2501	STANDARD A	white	0	0	4 ml
BA E-2502	STANDARD B	yellow	75	727	4 ml
BA E-2503	STANDARD C	orange	250	2,425	4 ml
BA E-2504	STANDARD D	blue	750	7,275	4 ml
BA E-2505	STANDARD E	grey	2,500	24,250	4 ml
BA E-2506	STANDARD F	black	7,500	72,750	4 ml
BA E-2551	CONTROL 1	green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range.		4 ml
BA E-2552	CONTROL 2	red			4 ml
Conversion:	GABA [ng/ml] x 9.7 = GABA [nmol/l]				
Content:	Acidic buffer with non-mercury preservative, spiked with defined quantity of GABA				

4.3 Additional materials required but not provided in the kit

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

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

4.4 Additional equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 – 500 µl; 12.5 ml
- Microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 – 650 nm
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Vortex mixer

5. Sample collection, handling and storage

Urine
Spontaneous urine (second morning urine) stabilized with 10 µl 6 M HCl per 1 ml of urine sample can be used. The measurement results are related to the creatinine content of the sample.
Storage: up to 6 hours (18 – 25 °C); up to 14 days (2 – 8 °C); up to 6 months (< -15 °C).
Repeated freezing and thawing should be avoided. Avoid exposure to direct sunlight.

6. Test procedure

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the Extraction Plate, Macrotiter Plate and microwell plates (Microtiter Strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up). Duplicate determinations are recommended.
The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. Varying incubation times will have similar influences on the absorbance. The optimal temperature during the enzyme immunoassay is between 20 – 25 °C.
If the product is prepared in parts, unused wells in Extraction and Macrotiter Plates should be covered to avoid contamination. After preparation, the used wells must be labelled to prevent double use.
During the overnight incubation at 2 – 8 °C with the antiserum, the temperature should be uniform all over the ELISA plate to avoid any drift and edge-effect.

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

6.1 Preparation of reagents and further notes

Wash Buffer
Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate **WASH-CONC** **50X** with water to a final volume of 1000 ml.
Storage: 2 months at 2 – 8 °C

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

I-Buffer
Dilute the 4 ml **I-BUFFER** with water (deionized, distilled, or ultra-pure) to a final volume of 400 ml.
Storage: 2 months at 2 – 8 °C

D-Reagent
The **D-REAGENT** has a freezing point of 18.5 °C. Make sure that the **D-REAGENT** has reached room temperature and forms a homogeneous, crystal-free solution.

GABA 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.

Extraction Plate
In rare cases residues of the cation exchanger can be seen in the wells as small, black dots or lines. These residues do not influence the quality of the product.

6.2 Preparation of samples – Extraction

1.	Pipette **100 µl** of the **standards, controls** and **samples** into the appropriate wells of the **EXTRACT-PLATE** **48**.
2.	Add **100 µl** of the **DILUENT** to all wells. Cover plate with **FOILS** and incubate for **15 min** at **RT** (20 – 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
3.	**Discard** and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material. **Add 500 µl** of **I-Buffer** to each well and incubate for **5 min** at **RT** (20 – 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
4.	**Discard** the wash and blot dry by tapping the inverted plate on absorbent material.
5.	Pipette **150 µl** of **ELUTION-BUFF** into the appropriate wells of the **EXTRACT-PLATE** **48**. Cover plate with **FOILS** and incubate for **10 min** at **RT** (20 – 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
6.	Use **100 µl** for the subsequent **derivatization**!

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

6.3 Derivatization

1.	Pipette **100 µl** of the **extracted standards, controls** and **samples** into the appropriate wells of the **Macrotiter Plate** **48**.
2.	Pipette **10 µl** of the **NAOH** into all wells.
3.	Add **50 µl** of the **Equalizing Reagent** (fresh prepared before assay) to all wells.
4.	Incubate for **1 min** on a shaker (approx. 600 rpm).
5.	Pipette **10 µl** of the **D-REAGENT** into all wells.
6.	Cover plate with **FOILS** and incubate for **2 h** at **RT** (20 – 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
7.	Pipette **100 µl** **Q-BUFFER** into all wells.
8.	Shake for **10 min** at **RT** (20 – 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
9.	**Use 50 µl for the subsequent ELISA!**

6.4 GABA ELISA

1.	Pipette **50 µl** of the **derivatized standards, controls** and **samples** into the appropriate wells of the **GABA Microtiter Strips** **GABA**.
2.	Pipette **50 µl** of the **AS** **GABA** 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 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 **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-SOLN** 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	GABA
	59.1 – 7,500 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.*

Urine samples and controls
The concentrations of the samples and controls can be read directly from the standard curve.
Samples found with concentrations higher than the highest standard (Standard F) should be diluted accordingly with water (deionized, distilled, or ultra-pure) and must be re-assayed. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Conversion:
GABA [ng/ml] x 9.7 = GABA [nmol/l]

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

7.1 Expected reference value

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

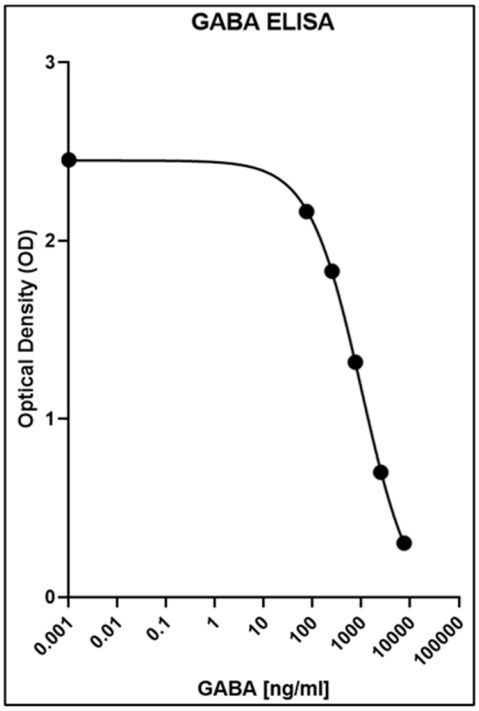
As a basis for the internal reference range determination, the following number of samples for the respective parameters was considered: n = 64. Expected reference ranges were determined in an internal study by testing spontaneous urine samples from an apparently healthy European population (95% reference interval).

	Urine
Expected reference value	206 – 1,548 µg/g creatinine 2 – 15 µmol/g creatinine 0.23 – 1.7 mmol/mol creatinine

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

7.2 Typical standard curve

⚠ *Example: Do not use for calculation!*



8. Control samples

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

9. Assay characteristics

9.1 Performance data

Analytical Sensitivity	
	GABA
Limit of Blank (LOB)	19.6 ng/ml
Limit of Detection (LOD)	30.4 ng/ml
Limit of Quantification (LOQ)	59.1 ng/ml

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

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	
Substance	**Cross Reactivity [%]**
	GABA
3-Aminobutanoic acid	< 0.1
L-(+)-2-Aminobutyric acid	< 0.1
ß-Alanine	0.8
L-Aspartic acid	< 0.1
(S)-(+)-Glutamine	< 0.1
Glycine	< 0.1
L-Glutamic acid	< 0.1

Precision					
Intra-Assay			**Inter-Assay**		
Urine, n = 12			**Urine**, n = 13		
Sample	Mean ± SD [ng/ml]	CV [%]	Sample	Mean ± SD [ng/ml]	CV [%]
1	135 ± 32	23.7	1	205 ± 25.4	12.4
2	241 ± 30	12.6	2	426 ± 40	9.4
3	451 ± 41	9.2	3	944 ± 69	7.3
4	1,021 ± 56	5.5	4	2,763 ± 195	7.1
5	2,871 ± 200	7.2			
6	6,327 ± 322	5.1			

Lot-to-Lot			
	Sample	Mean ± SD [ng/ml]	CV [%]
GABA in urine (n = 3)	1	826 ± 82.5	10.0
	2	2,526 ± 129	5.1
GABA in artificial matrix (n = 3)	3	1,229 ± 21.0	1.7

Recovery was determined according to the CLSI standard EP 34 1st ed.

Recovery			
	Range [ng/ml]	Mean [%]	Range [%]
Urine	157 – 4,832	101	86 – 111

Linearity			
	Serial dilution up to	Mean [%]	Range [%]
Urine	1:64	110	98 – 123

9.2 Metrological Traceability

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

Standards and Controls	
	Uncertainty [%]
GABA	1.6

GABA ELISA	
Concentration [ng/ml]	Expanded Uncertainty [%] k = 2*
205	25.0
426	19.1
944	15.0
2,763	14.6

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

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

10. References/Literature

1. Bieger, W.P., *NeuroStress Guide*. 2011.
2. Bustillo, J.R., *Use of proton magnetic resonance spectroscopy in the treatment of psychiatric disorders: a critical update.* Dialogues Clin Neurosci, 2013. **15**(3): p. 329-37.
3. Duman, R.S., G. Sanacora, and J.H. Krystal, *Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments.* Neuron, 2019. **102**(1): p. 75-90.
4. Femenía, T., et al., *Dysfunctional hippocampal activity affects emotion and cognition in mood disorders.* Brain Res, 2012. **1476**: p. 58-70.
5. Flasnoecker, M., *Reise aus dem Stress - Körper, Geist und Psyche stärken*. 2015: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH.
6. Frisardi, V., F. Panza, and A.A. Farooqui, *Late-life depression and Alzheimer's disease: the glutamatergic system inside of this mirror relationship.* Brain Res Rev, 2011. **67**(1-2): p. 344-55.
7. Gao, S.F. and A.M. Bao, *Corticotropin-releasing hormone, glutamate, and γ-aminobutyric acid in depression.* Neuroscientist, 2011. **17**(1): p. 124-44.
8. Harris, R.E. and D.J. Clauw, *Imaging central neurochemical alterations in chronic pain with proton magnetic resonance spectroscopy.* Neurosci Lett, 2012. **520**(2): p. 192-6.
9. Kendell, S.F., J.H. Krystal, and G. Sanacora, *GABA and glutamate systems as therapeutic targets in depression and mood disorders.* Expert Opin Ther Targets, 2005. **9**(1): p. 153-68.
10. Krystal, J.H., et al., *Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments.* Mol Psychiatry, 2002. **7 Suppl 1**: p. S71-80.
11. Lener, M.S., et al., *Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid Systems in the Pathophysiology of Major Depression and Antidepressant Response to Ketamine.* Biol Psychiatry, 2017. **81**(10): p. 886-897.
12. Sanacora, G., G. Treccani, and M. Popoli, *Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders.* Neuropharmacology, 2012. **62**(1): p. 63-77.
13. Strienz, J., *Nebennierenunterfunktion - Stress stört die Hormonbalance*. 3 ed. 2019: W. Zuckschwerdtverlag München.

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

11. Changes

Version	Release Date	Chapter	Change
17.0	2024-05-22	4.1 7.2 9.1 9.2	- Hazard labelling updated according to SDS - Typical standard curve updated - Lot-to-Lot added, Recovery updated - Chapter Metrological Traceability added
18.0	2024-09-27	N/A	- Symbols formated
19.0	2025-11-25	2.1 4.1	- Updated - Hazard labelling updated according to SDS

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

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 Gamma-Aminobuttersäure (GABA) in Urin, um das GABA-Gleichgewicht zu beurteilen. Die Bestimmung von GABA in Urin hilft u.a. bei der Beurteilung von Neurostress.
Im ersten Teil der Durchführung wird Gamma-Aminobuttersäure (GABA) extrahiert und derivatisiert und anschließend quantitativ im ELISA bestimmt.
Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an die feste Phase der Mikrotiterplatte gebunden. Die derivatisierten Analytkonzentrationen der Standards, Kontrollen und Proben und die an die Festphase gebundenen Analyten 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

GABA (γ-Aminobuttersäure) ist einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des zentralen Nervensystems (ZNS). GABA wirkt über Interneurone in erster Linie durch Hemmung der präsynaptischen Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter. Im ZNS wird GABA aus L-Glutaminsäure gebildet, welches als Neurotransmitter an erregenden Synapsen eingesetzt wird.
Viele Publikationen und viele Naturheilpraxen postulieren, dass die Bestimmung von GABA u.a. bei der Beurteilung von Neurostress hilft. Neurostress ist ein Sammelbegriff für eine Vielzahl körperlicher und psychischer Beschwerden, welche durch unsere moderne Lebensweise, ungünstige Umweltbedingungen, falsche Ernährung, Medikamente, beruflichen und sozialen Stress, Schlafmangel, Reizüberflutung oder auch genetische Veranlagung verursacht werden. Zu den ausgelösten Beschwerden zählen Burn-Out**,** Depressionen**,** Insomnie (Schlafstörungen)**,** Chronic Fatigue Syndrome (CFS)**,** Fibromyalgie (FM)**,** MCS (Multiple Chemikalien-sensitivität) und andere chronische Krankheitsbilder. Darüber hinaus berichten viele Veröffentlichungen von einem gestörten bzw. veränderten oder dysregulierten GABA-Haushalt bei unterschiedlichen Beschwerden, wie z. B. Stress, Schlafmangel, Burn-Out, Depressionen usw.. Aus diesem Grund bieten einige Labore und Naturheilpraxen die Bestimmung von Neurostress-Profilen an, in denen u. a. GABA-Level bestimmt werden. In speziell diesem Fall wird GABA hauptsächlich über den zweiten Morgenurin durch unterschiedliche Methoden nachgewiesen. Allerdings sollten neben der Bestimmung von GABA weitere Analyten (wie Glutamat, Serotonin, Noradrenalin, Dopamin und evtl. Adrenalin, Melatonin, DHEA und Cortisol) bestimmt werden, um ein fundiertes Neurostressprofil erstellen zu können.
Liegen die mit diesem Test bestimmten GABA-Level nicht im Referenzbereich, sollte diese mit einem Therapeuten und/oder Arzt abgeklärt werden.
Therapeutische Konsequenzen dürfen niemals allein auf Grund von Laborwerten herangezogen werden, auch wenn diese Werte in Übereinstimmung mit den Qualitätskriterien der Methode beurteilt werden. Jedes Laborergebnis trägt immer nur zu einem Teil des klinischen Bildes bei.
Nur wenn die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild stehen, dürfen daraus therapeutische Konsequenzen abgeleitet werden.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

(1) Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Gebrauchsanweisung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
(2) Dieser Assay wurde für die unter Verwendungszweck (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
(3) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
(4) Geeignete persönliche Schutzausrüstung (Kittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille) ist zu tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
(5) Falls in Zusammenhang mit diesem Produkt schwerwiegende Vorfälle auftreten sollten, sollen diese dem Hersteller und den zuständigen nationalen Behörden gemeldet werden.
(6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Verwenden Sie für Verdünnungs- oder Rekonstitutionszwecke deionisiertes, destilliertes oder ultrareines Wasser. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
(7) Die Mikrotiterplatte verfügt über einzeln herausnehmbare und abbrechbare Streifen. Ungenutzte Wells müssen bei 2 – 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden. Die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden.

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

(8) Standards, Kontrollen und 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, potenziell 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

Spontanurin
Probenbehandlung genau beachten! Es ist nicht auszuschließen, dass ein zu hoher Säuregehalt zu falschen Ergebnissen führen kann. Bis zu 20 µl 6 M HCl pro 1 ml Urin wurde kein Einfluss auf die Ergebnisse beobachtet.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel

Es wird empfohlen Nahrungsergänzungsmittel, die GABA-regulierende Substanzen (Zitronenmelisse, Baldrian, Vitamin B6, L-Theanin und Kava) enthalten, 24 Stunden vor Probennahme nicht einzunehmen.
Des Weiteren sind zusätzliche Diätmaßnamen vor Probennahme nicht in der Literatur beschrieben.
Bei auffälligen GABA-Werten wird empfohlen zu prüfen, ob Wechselwirkungen mit den genannten Substanzen als mögliche Ursache in Frage kommen.

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. Nicht sofort verwendetes rekonstituiertes Ausgleichsreagenz muss in Aliquots für maximal 2 Monate bei < -15 °C gelagert werden und darf nur einmal aufgetaut 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-0033	**MTP 48**	**Makrotiterplatte** – gebrauchsfertig
Inhalt:	2 x 48 Well-Platte, leer, in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA D-0090	**FOILS**	**Selbstklebende Folie** – gebrauchsfertig
Inhalt:	Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Anzahl:	3 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	

Please use only the valid version of the instructions for use provided with the kit

BA E-0040	**CONJUGATE**	**Enzymkonjugat** – gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege anti-Kaninchen Immunoglobuline, 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-2413	**ASSAY-BUFF**	**Assaypuffer** – gebrauchsfertig
Inhalt:	Puffer mit alkalischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel gelb	
Gefahren-piktogramme:	GHS08 GHS07	
Signalwort:	Gefahr	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	Borsäure	
Gefahren-hinweise:	H360FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.	
Sicherheits-hinweise:	P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P280 Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz, Gesichtsschutz tragen. P308+P313 BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
Zusätzliche Hinweise:	Nur für gewerbliche Anwender.	
BA E-2428	**EQUA-REAG**	**Ausgleichsreagenz** – lyophilisiert
Inhalt:	Lyophilisiertes Protein	
Volumen:	1 Fläschchen, Deckel braun	
BA E-2442	**EXTRACT-PLATE** **48**	**Extraktionsplatte** – gebrauchsfertig
Inhalt:	2 x 48 Well-Platte, beschichtet mit Kationenaustauscher in einem wiederverschließbaren Beutel	

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

BA E-2446	**D-REAGENT**	**D-Reagent** – gebrauchsfertig
Inhalt:	Crosslinker in Dimethylsulfoxid	
Volumen:	1 x 3 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
Gefahren-piktogramme:	GHS07	
Signalwort:	Achtung	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	Glutaraldehyd	
Gefahren-hinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.	
Sicherheits-hinweise:	P261 Einatmen von Nebel, Aerosol, Dampf vermeiden. P280 Schutzhandschuhe tragen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
BA E-2458	**Q-BUFFER**	**Q-Buffer** – gebrauchsfertig
Inhalt:	TRIS-Puffer	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
BA E-2510	**AS** **GABA**	**GABA Antiserum** – gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen Anti-GABA-Antikörper im Proteinpuffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel, blau gefärbt	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau	
Beschreibung:	Spezies vom Antikörper ist Kaninchen, Spezies vom Protein im Puffer ist Rind	
BA E-2531	**MTP** **GABA**	**GABA Mikrotiterstreifen** – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Wells (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA E-2541	**ELUTION-BUFF**	**Eluierungspuffer** – gebrauchsfertig
Inhalt:	Puffer mit Zitronensäure	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel grün	
BA E-2560	**DILUENT**	**Diluent** – gebrauchsfertig
Inhalt:	Puffer mit saurem pH	
Volumen:	2 x 20 ml/Fläschchen, Deckel blau	
Gefahren-piktogramme:	GHS07	
Signalwort:	Achtung	
BA E-2561	**I-BUFFER**	**I-Buffer** – konzentriert
Inhalt:	Puffer mit nicht-ionischem Detergenz und quecksilberfreiem Konservierungsmittel	
Volumen:	1 x 4 ml/Fläschchen, Deckel rot	
BA E-2787	**NAOH**	**NaOH** – gebrauchsfertig
Inhalt:	Verdünnte Natronlauge	
Volumen:	1 x 2 ml/Fläschchen, Deckel lila	
Gefahren-piktogramme:	GHS07	
Signalwort:	Achtung	

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

4.2 Kalibratoren und Kontrollen

Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration [ng/ml]	Konzentration [nmol/l]	Volumen/ Fläschchen
BA E-2501	**STANDARD A**	weiß	0	0	4 ml
BA E-2502	**STANDARD B**	gelb	75	727	4 ml
BA E-2503	**STANDARD C**	orange	250	2.425	4 ml
BA E-2504	**STANDARD D**	blau	750	7.275	4 ml
BA E-2505	**STANDARD E**	grau	2.500	24.250	4 ml
BA E-2506	**STANDARD F**	schwarz	7.500	72.750	4 ml
BA E-2551	**CONTROL 1**	grün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Vertrauensbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.		4 ml
BA E-2552	**CONTROL 2**	rot			4 ml

Umrechnung: GABA [ng/ml] x 9,7 = GABA [nmol/l]

Inhalt: Saurer Puffer aufgestockt mit einer definierten Menge GABA

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

5. Probensammlung, -behandlung und -lagerung

Urin

Es soll Spontanurin (2. Morgenurin) verwendet werden, stabilisiert mit 10 µl 6 M HCl auf 1 ml Urin. Die Messergebnisse werden auf den Kreatiningehalt der Probe bezogen.
Lagerung: Bis zu 6 Stunden (18 – 25 °C); bis zu 14 Tagen (2 – 8 °C); bis zu 6 Monaten (< -15 °C)
Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sowie direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Extraktions-, Makrotiter- 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 Extraktions- und Makrotiterplatten 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 Randeffekt zu vermeiden.

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

6.1 Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC** **50X** mit Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.
Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

Ausgleichsreagenz

Den Inhalt eines 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. 2 Monate bei < -15 °C gelagert werden (nur einmal auftauen).

I-Puffer

4 ml **I-BUFFER** mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 400 ml verdünnen.
Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

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

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.

GABA 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.

Extraktionsplatte
Vereinzelt können Rückstände des Ionenaustauschers in den Wells zu sehen sein (kleine schwarze Punkte oder Linien). Diese stellen keine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes dar.

6.2 Probenvorbereitung – Extraktion

1.	Jeweils **100 µl** der **Standards**, **Kontrollen** und **Proben** in die entsprechenden Wells der **EXTRACT-PLATE 48** pipettieren.
2.	Jeweils **100 µl** **DILUENT** in alle Wells pipettieren. Platte mit **FOILS** abdecken und **15 Min** bei **RT** (20 – 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
3.	Den Inhalt der Wells **ausleeren** und die Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. Jeweils **500 µl I-Puffer** (siehe 6.1) in alle Wells pipettieren und für **5 Min** bei **RT** (20 – 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	Die **EXTRACT-PLATE 48** ausleeren und Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5.	**150 µl** **ELUTION-BUFF** in die entsprechenden Wells der **EXTRACT-PLATE 48** pipettieren. Platte mit **FOILS** abdecken und **10 Min** bei **RT** (20 – 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
6.	Jeweils **100 µl** für die **Derivatisierung** verwenden!

6.3 Derivatisierung

1.	Jeweils **100 µl** der **extrahierten Standards**, **Kontrollen** und **Proben** in die entsprechenden Wells der **Makrotiterplatte** **48** pipettieren.
2.	Jeweils **10 µl** **NAOH** in alle Wells pipettieren.
3.	Jeweils **50 µl Ausgleichsreagenz** *(siehe 6.1)* in alle Wells pipettieren.
4.	**1 Min** auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
5.	Jeweils **10 µl** **D-REAGENT** in alle Wells pipettieren.
6.	Platte mit **FOILS** abdecken und **2 Stunden** bei **RT** (20 – 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
7.	Jeweils **100 µl** **Q-BUFFER** in alle Wells pipettieren.
8.	Für **10 Min** bei **RT** (20 – 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
9.	**Jeweils 50 µl für den ELISA verwenden!**

6.4 GABA ELISA

1.	**50 µl** der **derivatisierten Standards, Kontrollen** und **Proben** in die entsprechenden Wells der **GABA Mikrotiterstreifen** **GABA** pipettieren.
2.	**50 µl** **AS** **GABA** in alle Wells hinzugeben und kurz schütteln.
3.	Platte mit **FOILS** abdecken und für **15 – 20 Stunden** (über Nacht) bei **2 – 8 °C** inkubieren.
4.	**FOILS** entfernen und den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells **3-mal** gründlich mit **300 µl Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5.	**100 µl** **CONJUGATE** in alle Wells pipettieren.
6.	Für **30 Min** bei **RT** (20 – 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
7.	Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells **3-mal** gründlich mit **300 µl Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
8.	**100 µl** **SUBSTRATE** in alle Wells pipettieren und für **20 – 30 Min** bei **RT** (20 – 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren. ⚠ ***Direktes Sonnenlicht vermeiden!***
9.	**100 µl** der **STOP-SOLN** in alle Wells pipettieren und die Miktrotiterplatte 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.**

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

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	GABA
	59,1 – 7.500 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 Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

Umrechnung:

GABA [ng/ml] x 9,7 = GABA [nmol/l]

7.1 Erwartete Referenzbereiche

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

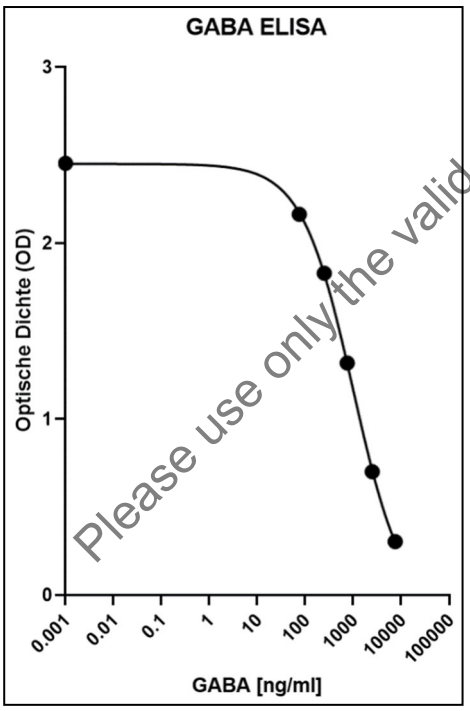
Als Grundlage für die interne Referenzbereichsbestimmung wurde folgende Probenanzahl für die jeweiligen Parameter berücksichtigt: n = 64. Die erwarteten Referenzbereiche wurden in einer internen Studie durch die Untersuchung von Spontanurinproben aus einer offensichtlich gesunden europäischen Bevölkerung ermittelt (95% Referenzintervall).

	Urin
Erwarteter Referenzbereich	206 – 1.548 µg/g Kreatinin 2 – 15 µmol/g Kreatinin 0,23 – 1,7 mmol/mol Kreatinin

Deutlich außerhalb des Referenzbereichs liegende Werte sollen ärztlich bewertet werden.

7.2 Typische Standardkurve

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



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

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	
	GABA
Limit of Blank (LOB)	19,6 ng/ml
Limit of Detection (LOD)	30,4 ng/ml
Limit of Quantification (LOQ)	59,1 ng/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)	
Substanz	**Kreuzreaktion [%]**
	GABA
β-Aminobuttersäure	< 0,1
α-Aminobuttersäure	< 0,1
ß-Alanin	0,8
L-Asparaginsäure	< 0,1
(S)-(+)-Glutamin	< 0,1
Glycin	< 0,1
L-Glutaminsäure	< 0,1

Präzision					
Intra-Assay			**Inter-Assay**		
Urin, n = 12			**Urin**, n = 13		
Probe	Mittelwert ± SD [ng/ml]	CV [%]	Probe	Mittelwert ± SD [ng/ml]	CV [%]
1	135 ± 32	23,7	1	205 ± 25,4	12,4
2	241 ± 30	12,6	2	426 ± 40	9,4
3	451 ± 41	9,2	3	944 ± 69	7,3
4	1.021 ± 56	5,5	4	2.763 ± 195	7,1
5	2.871 ± 200	7,2			
6	6.327 ± 322	5,1			

Lot-zu-Lot			
	Probe	Mittelwert ± SD [ng/ml]	CV [%]
GABA in Urin (n = 3)	1	826 ± 82,5	10,0
	2	2.526 ± 129	5,1
GABA in künstlicher Matrix (n = 3)	3	1.229 ± 21,0	1,7

Die Wiederfindung wurde bestimmt nach dem CLSI Standard EP 34 1st ed.

Wiederfindung			
	Bereich [ng/ml]	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Urin	157 – 4.832	101	86 – 111

Linearität			
	Serielle Verd. bis	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Urin	1:64	110	98 – 123

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

9.2 Metrologische Rückführbarkeit

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

Standards und Kontrollen	
	Unsicherheit [%]
GABA	1,6

GABA ELISA	
Konzentration [ng/ml]	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
205	25,0
426	19,1
944	15,0
2.763	14,6

* 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. Bieger, W.P., *NeuroStress Guide*. 2011.
2. Bustillo, J.R., *Use of proton magnetic resonance spectroscopy in the treatment of psychiatric disorders: a critical update.* Dialogues Clin Neurosci, 2013. **15**(3): p. 329-37.
3. Duman, R.S., G. Sanacora, and J.H. Krystal, *Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments.* Neuron, 2019. **102**(1): p. 75-90.
4. Femenía, T., et al., *Dysfunctional hippocampal activity affects emotion and cognition in mood disorders.* Brain Res, 2012. **1476**: p. 58-70.
5. Flasnoecker, M., *Reise aus dem Stress - Körper, Geist und Psyche stärken*. 2015: W. Zuckschwerdt Verlag GmbH.
6. Frisardi, V., F. Panza, and A.A. Farooqui, *Late-life depression and Alzheimer's disease: the glutamatergic system inside of this mirror relationship.* Brain Res Rev, 2011. **67**(1-2): p. 344-55.
7. Gao, S.F. and A.M. Bao, *Corticotropin-releasing hormone, glutamate, and γ-aminobutyric acid in depression.* Neuroscientist, 2011. **17**(1): p. 124-44.
8. Harris, R.E. and D.J. Clauw, *Imaging central neurochemical alterations in chronic pain with proton magnetic resonance spectroscopy.* Neurosci Lett, 2012. **520**(2): p. 192-6.
9. Kendell, S.F., J.H. Krystal, and G. Sanacora, *GABA and glutamate systems as therapeutic targets in depression and mood disorders.* Expert Opin Ther Targets, 2005. **9**(1): p. 153-68.
10. Krystal, J.H., et al., *Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments.* Mol Psychiatry, 2002. **7 Suppl 1**: p. S71-80.
11. Lener, M.S., et al., *Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid Systems in the Pathophysiology of Major Depression and Antidepressant Response to Ketamine.* Biol Psychiatry, 2017. **81**(10): p. 886-897.
12. Sanacora, G., G. Treccani, and M. Popoli, *Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders.* Neuropharmacology, 2012. **62**(1): p. 63-77.
13. Strienz, J., *Nebennierenunterfunktion - Stress stört die Hormonbalance*. 3 ed. 2019: W. Zuckschwerdtverlag München.

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	2024-05-22	4.1 7.2 9.1 9.2	- Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert - Typische Standardkurve aktualisiert - Lot-zu-Lot hinzugefügt, Wiederfindung aktualisiert - Metrologische Rückführbarkeit hinzugefügt
18.0	2024-09-27	N/A	- Symbole formatiert
19.0	2025-11-25	2.1 4.1	- Aktualisiert - Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert

Please use only the valid version of the instructions for use provided with the kit

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

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	