

Instructions for use / Gebrauchsanweisung

Glutamate ELISA

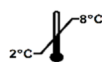
REF**BA E-2400****IVD**

Table of contents

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

Inhaltsverzeichnis

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

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of L-glutamate in urine, to evaluate L-glutamate homeostasis. The determination of L-glutamate in urine is helpful for the determination of neurostress.

After extraction and derivatisation Glutamate 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 in 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

Glutamate, also known as glutamic acid, is one of the most important excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS). It is released presynaptically and it binds postsynaptically to specific receptors for glutamate. The enzyme glutamic acid decarboxylase is able to convert L-glutamate in the CNS by decarboxylation to γ -aminobutyric acid (GABA), which acts as an inhibitory neurotransmitter.

Many publications postulate, that the determination of L-glutamate 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 deprivation, 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 many laboratories offer the determination of specific neurostress profiles including, among others, the determination of glutamate. In this case, glutamate is detected primarily in the second morning urine by several methods. To generate a profound neurostress profile, also other analytes (serotonin, norepinephrine, dopamine, epinephrine, melatonin, DHEA and cortisol) should be determined.

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.
- (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

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

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

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

4. Materials

4.1 Contents of the kit

BA D-0024	REAC-PLATE	Reaction Plate – ready to use
Content:	1 x 96 well plate, empty, in a resealable pouch	
BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil – ready to use
Content:	Adhesive foils in a resealable pouch	
Number:	1 x 4 foils	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate – concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, purple cap	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate – ready to use
Content:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
Description:	Species is goat	
Hazard pictograms:		
	GHS07	
Signal word:	Warning	
Hazardous ingredients:	2-methyl-2H-isothiazol-3-one	
Hazard statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.	
Precautionary statements:	P280 Wear protective gloves. P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.	

BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate – ready to use
Content:	Chromogenic substrate containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 ml/vial, black cap	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution – ready to use
Content:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 ml/vial, grey cap	
BA E-2410	AS GLUT	Glutamate Antiserum – ready to use
Content:	Rabbit anti-glutamate antibody in buffer with proteins and non-mercury preservative, blue coloured	
Volume:	1 x 6 ml/vial, blue 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-2431	W GLUT	Glutamate Microtiter Strips – ready to use
Content:	1 x 96 wells (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant	
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	
BA E-2460	DILUENT	Diluent – ready to use
Content:	Buffer with sodium acetate	
Volume:	1 x 20 ml/vial, green 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 [µg/ml]	Concentration [µmol/l]	Volume/ Vial
BA E-2401	STANDARD A	white	0	0	4 ml
BA E-2402	STANDARD B	yellow	0.6	4.08	4 ml
BA E-2403	STANDARD C	orange	2	13.6	4 ml
BA E-2404	STANDARD D	blue	6	40.8	4 ml
BA E-2405	STANDARD E	grey	20	136	4 ml
BA E-2406	STANDARD F	black	60	408	4 ml
BA E-2451	CONTROL 1	green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range.		4 ml
BA E-2452	CONTROL 2	red			4 ml

Conversion: glutamate [µg/ml] x 6.8 = glutamate [µmol/l]

Content: Acidic buffer with non-mercury preservatives, spiked with a defined quantity of glutamate.

4.3 Additional materials required but not provided in the kit

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

4.4 Additional equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 10 – 100 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 should be used. The measurement results are related to the creatinine content of the sample.

Storage: up to 6 hours at 18 – 25 °C; up to 14 days at 2 – 8 °C; up to 6 months at < -15 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided. Avoid exposure to direct sunlight.

6. Test procedure

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

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

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

6.1 Preparation of reagents and further notes

Wash Buffer

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

Storage: 2 months at 2 – 8 °C

Equalizing Reagent

Reconstitute the **EQUA-REAG** with **12.5 ml** of **ASSAY-BUFF**.

Reconstituted Equalizing Reagent which is not used immediately has to be stored in aliquots for max. 2 months at < -15 °C and may be thawed only once.

D-Reagent

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

Glutamate 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 urine 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 shake for 10 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
3.	Use 25 µl for the subsequent derivatization !

6.3 Derivatization

1.	Pipette 25 µl of the extracted standards, controls and urine samples into the appropriate wells of the REAC-PLATE .
2.	Pipette 10 µl of NAOH into all wells.
3.	Pipette 50 µl of the Equalizing Reagent into all wells.
4.	Pipette 10 µl of the D-REAGENT into all wells.
5.	Cover plate with FOILS and shake for 2 h at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
6.	Pipette 75 µl of the Q-BUFFER into all wells.
7.	Shake for 10 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
8.	Use 25 µl for the ELISA !

6.4 Glutamate ELISA

1.	Pipette 25 µl of the prepared standards, controls and urine samples into the appropriate wells of the Glutamate Microtiter Strips W GLUT .
2.	Pipette 50 µl of the AS GLUT 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 contents of the wells and 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	Glutamate	
	Urine	0.26 – 60 µg/ml

The standard curve, which can be used to determine the concentration of the unknown samples, is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis) using a concentration of 0.001 µg/ml for Standard A (this alignment is mandatory because of the logarithmic presentation of the data). Use non-linear regression for curve fitting (e.g. 4-parameter, marquardt).

⚠ *This assay is a competitive assay. This means: the OD-values are decreasing with increasing concentrations of the analyte. OD-values found below the standard curve correspond to high concentrations of the analyte in the sample and have to be reported as being positive.*

The concentrations of the samples and controls can be read directly from the standard curve.

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

Conversion:

Glutamate [µg/ml] × 6.8 = Glutamate [µmol/l]

7.1 Expected reference value

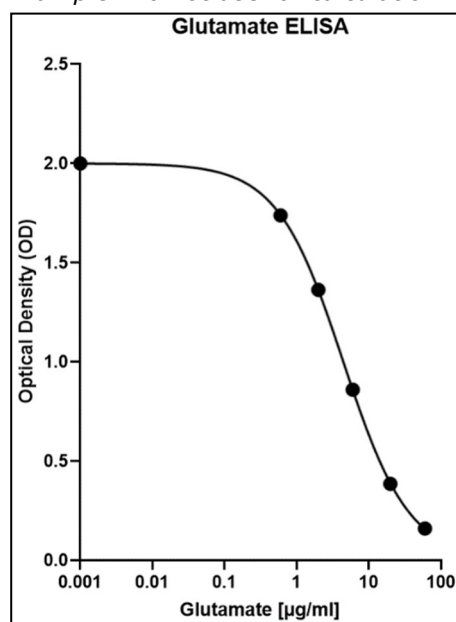
It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference values.

Spontaneous urine
1,034 – 7,726 µg/g creatinine 7 – 52.5 µmol/g creatinine 0.8 – 5.9 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	
	Glutamate
Limit of Blank (LOB)	0.11 µg/ml
Limit of Detection (LOD)	0.17 µg/ml
Limit of Quantification (LOQ)	0.26 µg/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	
Substance	Cross Reactivity [%]
	Glutamate
L-Glutamine	< 0.4
Glycine	< 0.4
β-Alanine	< 0.4
L-Alanine	< 0.4
L-Aspartic Acid	< 0.4
GABA	< 0.4
5-Amino-n-valeric Acid	< 0.4

Precision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
Sample	n	Mean ± SD [µg/ml]	CV [%]	Sample	n	Mean ± SD [µg/ml]	CV [%]
1	10	0.8 ± 0.1	10.8	1	13	1.7 ± 0.24	14.3
2	10	1.3 ± 0.1	8.7	2	14	5.0 ± 0.57	11.4
3	10	2.2 ± 0.1	6.3	3	14	10.6 ± 0.73	6.9
4	10	4.8 ± 0.2	4.0	4	13	3.0 ± 0.43	14.2
5	10	12.5 ± 0.6	4.6	5	14	5.6 ± 0.71	12.5
6	10	39.7 ± 2.2	5.6	6	14	10.0 ± 0.87	8.7

Lot-to-Lot			
	Sample	Mean ± SD [µg/ml]	CV [%]
Glutamate in urine (n=3)	1	13.3 ± 1.2	9.4
Glutamate in artificial matrix (n = 3)	2	5.0 ± 0.5	10.1

Recovery			
	Range [µg/ml]	Mean [%]	Range [%]
Urine	1.25 – 41.0	102	97 – 108

Linearity			
	Serial dilution up to	Mean [%]	Range [%]
Urine	1:64	105	94 – 113

9.2 Metrological Traceability

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

Standards and Controls	
	Uncertainty [%]
Glutamate	1.4

Glutamate ELISA	
Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Expanded Uncertainty [%] $k = 2^*$
1.7	28.7
5	23.0
10.6	14.1

* 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. Femenia, 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 gamma-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*. Neuropsychopharmacology, 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	2024-05-28	4.1 9.1 9.2	- Hazard labelling updated according to SDS - Lot-to-Lot added - Chapter Metrological Traceability added
18.0	2024-09-30	9.1	- Lot-to-Lot updated
19.0	2025-07-29	2.1 4.1	- Updated - Hazard labelling updated according to SDS

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture		Do not re-use		

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von L-Glutamat im Urin, um das Glutamat-Gleichgewicht zu beurteilen. Die Bestimmung von L-Glutamat in Urin hilft u. a. bei der Beurteilung von Neurostress.

Im ersten Teil der Durchführung wird Glutamat 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

Glutamat, auch Glutaminsäure genannt, ist einer der wichtigsten erregenden Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS). Er wird präsynaptisch freigesetzt und bindet postsynaptisch an spezifische Glutamat-Rezeptoren. Im ZNS kann L-Glutaminsäure durch das Enzym L-Glutaminsäuredecarboxylase zu γ -Aminobuttersäure (GABA) decarboxyliert werden, welches als Neurotransmitter an inhibitorischen Synapsen eingesetzt wird.

Viele Publikationen postulieren, dass die Bestimmung von Glutamat 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 Chemikaliensensitivität) und andere chronische Krankheitsbilder. Darüber hinaus berichten viele Veröffentlichungen von einem gestörten bzw. veränderten oder dysregulierten Glutathathaushalt bei unterschiedlichen Beschwerden. Aus diesem Grund bieten viele Labore die Bestimmung von Neurostress-Profilen an, in denen u. a. Glutamatlevel bestimmt werden. In speziell diesem Fall wird Glutamat hauptsächlich über den zweiten Morgenurin durch unterschiedliche Methoden nachgewiesen. Allerdings sollten neben der Bestimmung von Glutamat weitere Analyten (wie Serotonin, Noradrenalin, Dopamin und evtl. Adrenalin, Melatonin, DHEA und Cortisol) bestimmt werden, um ein fundiertes Neurostressprofil erstellen zu können.

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

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

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen**2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen**

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

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

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

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA D-0024	REAC-PLATE	Reaktionsplatte – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well-Platte, leer, in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA D-0090	FOILS	Selbstklebende Folie – gebrauchsfertig
Inhalt:	Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Anzahl:	1 x 4 Folien	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Waschpufferkonzentrat – 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel lila	

BA E-0040	CONJUGATE	Enzymkonjugat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege anti-Kaninchen Immunglobuline, konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot	
Beschreibung:	Spezies ist Ziege	
Gefahren- piktogramme:		
	GHS07	
Signalwort:	Achtung	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	2-Methyl-2H-isothiazol-3-on	
Gefahren- hinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.	
Sicherheits- hinweise:	P280 Schutzhandschuhe tragen. P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stopplösung – gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel grau	
BA E-2410	AS GLUT	Glutamat Antiserum – gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen Anti-Glutamat-Antikörper im Proteinpuffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel, blau gefärbt	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau	
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-2431	GLUT	Glutamat Mikrotiterstreifen – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Wells (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Beutel	

BA E-2442	EXTRACT-PLATE 48	Extraktionsplatte – gebrauchsfertig
Inhalt:	2 x 48 Well-Platte, beschichtet mit Kationenaustauscher in einem wiederverschließbaren Beutel	
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-2460	DILUENT	Diluent – gebrauchsfertig
Inhalt:	Natriumacetatpuffer	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel grün	
BA E-2787	NAOH	NaOH – gebrauchsfertig
Inhalt:	Verdünnte Natronlauge	
Volumen:	1 x 2 ml/Fläschchen, Deckel lila	
Gefahren- piktogramme:		
	GHS07	
Signalwort:	Achtung	

4.2 Kalibratoren und Kontrollen

Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration [µg/ml]	Konzentration [µmol/l]	Volumen/ Fläschchen
BA E-2401	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA E-2402	STANDARD B	gelb	0,6	4,08	4 ml
BA E-2403	STANDARD C	orange	2	13,6	4 ml
BA E-2404	STANDARD D	blau	6	40,8	4 ml
BA E-2405	STANDARD E	grau	20	136	4 ml
BA E-2406	STANDARD F	schwarz	60	408	4 ml
BA E-2451	CONTROL 1	grün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Vertrauensbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.		4 ml
BA E-2452	CONTROL 2	rot			4 ml
Umrechnung:	Glutamat [µg/ml] x 6,8 = Glutamat [µmol/l]				
Inhalt:	Saurer Puffer mit quecksilberfreien Stabilisatoren, aufgestockt mit definierten Mengen an Glutamat.				

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 – 100 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 bei 18 – 25 °C; bis zu 14 Tage bei 2 – 8 °C; bis zu 6 Monate bei < -15 °C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sowie direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

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

Die Bindung des Antikörpers, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassays liegt zwischen 20 – 25 °C. Wenn das Produkt in Teilen angesetzt wird, sollen nicht benötigte Wells in Reaktions- und Extraktionsplatten abgedeckt werden, um Verschmutzungen zu vermeiden. Nach dem Ansatz müssen die benutzten Wells gekennzeichnet werden, damit eine Doppelnutzung ausgeschlossen wird.

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

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

6.1 Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise

Waschpuffer

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

Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

Ausgleichsreagenz

Den Inhalt eines 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).

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.

Glutamat Mikrotiterstreifen

Vereinzelte 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

Vereinzelte 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 Urinproben in die entsprechenden Wells der EXTRACT-PLATE 48 pipettieren.
2.	Jeweils 100 µl DILUENT in alle Wells pipettieren. Platte mit FOILS abdecken und 10 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
3.	Jeweils 25 µl für die Derivatisierung verwenden!

6.3 Derivatisierung

1.	Jeweils 25 µl der extrahierten Standards, Kontrollen und Urinproben in die entsprechenden Wells der REAC-PLATE pipettieren.
2.	Jeweils 10 µl NAOH in alle Wells pipettieren.
3.	Jeweils 50 µl Ausgleichsreagenz in alle Wells pipettieren.
4.	Jeweils 10 µl D-REAGENT in alle Wells pipettieren.
5.	Platte mit FOILS abdecken und 2 Stunden bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
6.	Jeweils 75 µl Q-BUFFER in alle Wells pipettieren.
7.	Für 10 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
8.	Jeweils 25 µl für den ELISA verwenden!

6.4 Glutamate ELISA

1.	25 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Urinproben in die entsprechenden Wells der Glutamat Mikrotiterstreifen GLUT pipettieren.
2.	50 µl AS GLUT 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 STOP-SOLN in alle Wells 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	Glutamat	
	Urin	0,26 – 60 µg/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 µg/ml für Standard A (diese Ausrichtung ist aufgrund der logarithmischen Darstellung der Daten erforderlich) erstellt. Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z. B.: 4-parameter, marquardt) verwendet.

⚠ *Dieser Assay ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die OD-Werte mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. OD-Signale, die unterhalb der Standardkurve liegen, entsprechen einer sehr hohen Konzentration des Analyten in der gemessenen Probe und müssen als positiv gewertet werden.*

Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen können direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (Standard F) gefunden werden, müssen entsprechend mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

Umrechnung:

Glutamat [µg/ml] x 6,8 = Glutamat [µmol/l]

7.1 Erwartete Referenzbereiche

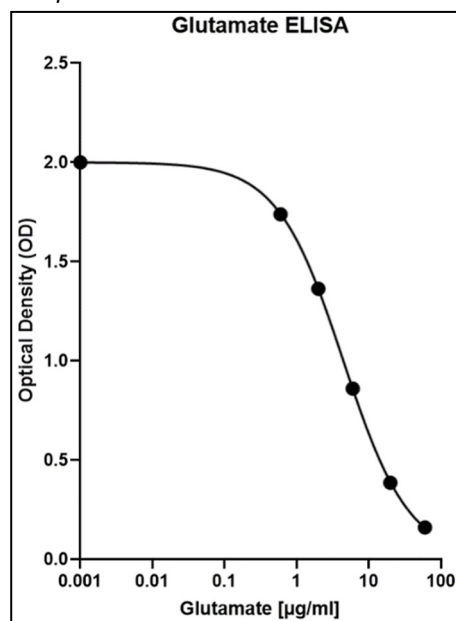
Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

Spontanurin	
	1.034 – 7.726 µg/g Kreatinin
	7 – 52,5 µmol/g Kreatinin
	0,8 – 5,9 mmol/mol Kreatinin

Deutlich außerhalb des Referenzbereichs liegende Werte sollen ärztlich bewertet werden.

7.2 Typische Standardkurve

⚠ Beispiel: Bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8. Kontrollproben

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen Vorschriften zu verwenden. Verwenden Sie Kontrollen im normalen und pathologischen Bereich. Kommerzielle Kontrollproben müssen dabei wie die 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	
	Glutamat
Limit of Blank (LOB)	0,11 µg/ml
Limit of Detection (LOD)	0,17 µg/ml
Limit of Quantification (LOQ)	0,26 µg/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)	
Substanz	Kreuzreaktion [%]
	Glutamat
L-Glutamin	< 0,4
Glycin	< 0,4
β-Alanin	< 0,4
L-Alanin	< 0,4
L-Aspartic Acid	< 0,4
GABA	< 0,4
5-Amino-n-valeric Acid	< 0,4

Präzision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
Probe	n	Mittelwert ± SD [µg/ml]	CV [%]	Probe	n	Mittelwert ± SD [µg/ml]	CV [%]
1	10	0,8 ± 0,1	10,8	1	13	1,7 ± 0,24	14,3
2	10	1,3 ± 0,1	8,7	2	14	5,0 ± 0,57	11,4
3	10	2,2 ± 0,1	6,3	3	14	10,6 ± 0,73	6,9
4	10	4,8 ± 0,2	4,0	4	13	3,0 ± 0,43	14,2
5	10	12,5 ± 0,6	4,6	5	14	5,6 ± 0,71	12,5
6	10	39,7 ± 2,2	5,6	6	14	10,0 ± 0,87	8,7

Lot-zu-Lot			
	Probe	Mittelwert ± SD [µg/ml]	CV [%]
Glutamat in Urin (n=3)	1	13,3 ± 1,2	9,4
Glutamat in artifizierter Matrix (n = 3)	2	5,0 ± 0,5	10,1

Wiederfindung			
	Bereich [µg/ml]	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Urin	1,25 – 41,0	102	97 – 108

Linearität			
	Serielle Verd. bis	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Urin	1:64	105	94 – 113

9.2 Metrologische Rückführbarkeit

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

Standards und Kontrollen	
	Unsicherheit [%]
Glutamat	1,4

Glutamate ELISA	
Konzentration [µg/ml]	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
1,7	28,7
5	23,0
10,6	14,1

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

10. Referenzen/Literatur

1. 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. Femenia, 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 gamma-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	2024-05-28	4.1 9.1 9.2	- Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert - Lot-zu-Lot hinzugefügt, Wiederfindung aktualisiert - Metrologische Rückführbarkeit hinzugefügt
18.0	2024-09-30	9.1	- Lot-zu-Lot aktualisiert
19.0	2025-07-29	2.1 4.1	- Aktualisiert - Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert

Symbole:

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