

BCAA Kit

**Zur in-vitro-Bestimmung von L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin in
EDTA-Plasma und Serum**

**For the in vitro determination of L-leucine, L-isoleucine and
L-valine in EDTA plasma and serum**

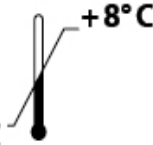
Gültig ab / Valid from 2016-07-06



K 7016



+2°C



ENZ



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: ++49 6251 70190-0

Fax: ++ 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. INHALT DER TESTPACKUNG	2
3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	2
4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	3
6. TESTDURCHFÜHRUNG	4
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema</i>	4
7. ERGEBNISSE	5
8. EINSCHRÄNKUNGEN	6
9. QUALITÄTSKONTROLLE	6
<i>Referenzwerte</i>	6
10. TESTCHARAKTERISTIKA	7
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	7
<i>Spike-Wiederfindung</i>	8
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Spezifität</i>	9
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
12. TECHNISCHE MERKMALE	10
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
14. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser Enzym-Test ist für die Bestimmung der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA, branched-chain amino acids) L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin in EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Bezeichnung	Kit Komponenten	Menge
K 7016	PLATE	Mikrotiterplatte	12 x 8 Vertiefungen
K 7016	STD	Standards, lyophilisiert (0, 100, 300, 1000 µmol/l)	4 x 1 Fläschchen
K 7016	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 Fläschchen
K 7016	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 Fläschchen
K 7016	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	16 ml
K 7016	REABUF	Reaktionspuffer, lyophilisiert	2 x 1 Fläschchen
K 7016	ENZ	Leucin-Dehydrogenase, Konzentrat	2 x 1 Fläschchen

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 340 nm

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25°C (≥18,2 MΩ cm).

4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Die lyophilisierten **Standards (STD)** und **Kontrollen (CTRL)** werden vor Gebrauch in jeweils **2,5 ml Reinstwasser** rekonstituiert. Die gelösten Standards und Kontrollen können bei **-20°C** gelagert werden. Das Wiedereinfrieren sollte sofort nach Entnahme erfolgen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Reaktionspuffer (REABUF)** wird in **3,0 ml Reinstwasser** gelöst und gut gemischt. Falls mehrere Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Gelöster Reaktionspuffer ist **6 Monate** bei **-20°C** haltbar.
- Das Enzym **Leucin-Dehydrogenase (ENZ)** lagert bei **-20°C**. Für den Test wird der Inhalt eines Fläschchens ENZ mit **2,4 ml Assaypuffer (ASYBUF)** aufgefüllt und gut gemischt. Falls mehrere Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. So verdünntes ENZ ist **6 Monate** bei **-20°C** haltbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

EDTA-Plasma und Serum

- Die Proben sind 48 h bei 2-8°C haltbar. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20°C aufbewahrt werden.
- Die Plasmaproben werden **unverdünnt** verwendet.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Es handelt sich bei dem vorliegenden Test um einen photometrischen Test zur Bestimmung von Leucin, Isoleucin und Valin über eine oxidative Desaminierung, bei der NAD^+ zu NADH überführt wird.

Bei der Reaktion werden die Aminosäuren L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin durch das Enzym L-Leucindehydrogenase in die entsprechenden α -Ketokörper umgesetzt, wobei NAD^+ zu NADH reduziert wird. Diese Übertragungsreaktion kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden und ist proportional zur Menge an oxidierten BCAA.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15-30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/ Kontrollen/ Proben in einem Protokollblatt.

Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	2 x 25 μl Standard/ Kontrolle/ Probe (STD/ CTRL/ SAMPLE) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte (PLATE) pipettieren.
2.	Jeweils 100 μl Reinstwasser in alle verwendeten Vertiefungen pipettieren.
3.	50 μl Assaypuffer (ASYBUF) in jede Vertiefung pipettieren.
4.	50 μl Reaktionspuffer (REABUF) in jede Vertiefung geben und die Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 340 nm messen (OD_{BLANK}).
5.	50 μl verdünnte Leucin-Dehydrogenase (ENZ) in alle Vertiefungen pipettieren. Streifen luftdicht abdecken.
6.	60 min bei Raumtemperatur inkubieren.

7.	Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer bei 340 nm messen (OD_{SAMPLE}).
8.	Die Auswertung der Rohdaten erfolgt wie in Kapitel 7 „Ergebnisse“ beschrieben.

7. ERGEBNISSE

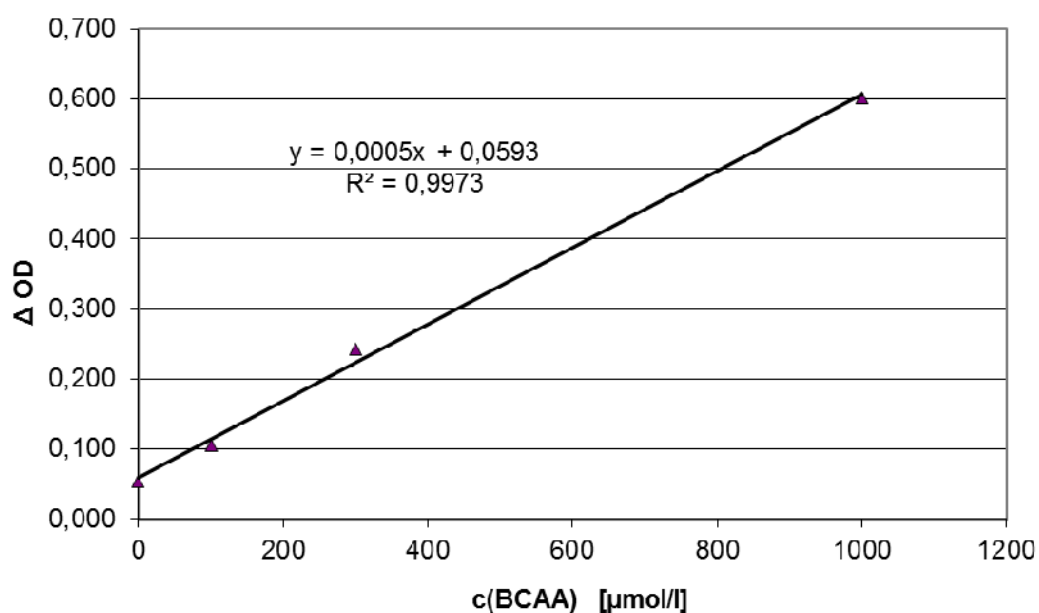
Zur Auswertung werden die OD-Werte des Blank (OD_{BLANK}) von den OD-Werten nach Enzymzugabe (OD_{SAMPLE}) abgezogen:

$$\Delta OD = OD_{\text{SAMPLE}} - OD_{\text{BLANK}}$$

Die Differenz-OD (ΔOD) der Standards werden gegen die Standard-Konzentrationen in einem Diagramm aufgetragen. Mit der daraus erhaltenen Geradengleichung können die BCAA-Konzentrationen der Proben berechnet werden.

$$\text{BCAA } [\mu\text{mol/l}] = \frac{\Delta OD - \text{Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}}$$

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.



8. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten mit Reinstwasser vorverdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diesen Verdünnungsfaktor bei der Ergebnisberechnung.

9. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich gesunden Personen (n = 146) wurde ein Mittelwert von 460 µmol/l ermittelt, bei einer Standardabweichung von 110,5 µmol/l.

Plasma-Mittelwert ± 2 Standardabweichungen **460 ± 221 µmol/l**

Normalbereich: **239 – 681 µmol/l**

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Serum

Intra-Assay (n = 6)

Probe	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	448	5,5
2	382	4,2

Inter-Assay (n = 6)

Probe	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	465	3,7
2	193	8,9
3	425	6,6
4	171	8,0

EDTA-Plasma

Intra-Assay (n = 6)

Probe	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	453	9,3
2	1337	2,6

Inter-Assay (n = 6)

Probe	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	VK [%]
1	1627	3,1
2	828	3,6
3	1418	4,1
4	706	4,0

Spike-Wiederfindung

Zwei Serum- bzw. Plasmaproben wurden mit unterschiedliche Mengen an BCAA versetzt und anschließend im Enzymtest gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug bei EDTA-Plasma 93,8 %, bei Serum 94,3 % (n = 2).

EDTA-Plasma

Probe	Spike [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
A			577	
	1500	1039	952	91,7
	3000	1789	1665	93,1
B			441	
	1500	970	895	92,2
	3000	1720	1691	98,2

Serum

Probe	Spike [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
A			387	
	1500	944	938	99,4
	3000	1694	1551	91,6
B			453	
	1500	977	901	92,2
	3000	1727	1625	94,1

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Serum- bzw. Plasmaproben wurden mit Reinstwasser verdünnt und gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug für EDTA-Plasma 95,4 %, für Serum 88,1 % (n = 2).

EDTA-Plasma

Probe	Verdünnung	BCAA erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
A			577	
	1:2	289	266	92,1
B			1590	
	1:2	795	785	100,0

Serum

Probe	Verdünnung	BCAA erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
A			167	
	1:2	194	266	87,6
B			201	
	1:2	227	785	88,6

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 14 x der STD 1 (Null-Standard). Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 5,8 $\mu\text{mol/l}$.

Probe	Mittelwert [OD]	2 Standard- abweichungen (2 x SD)	Nachweis- grenze [$\mu\text{mol/l}$]
STD 1	0,06	0,0023	5,8

Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Es wurde keine Kreuzreaktivität zu L-Methionin gefunden.

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder ProClin zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immunodiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immunodiagnostik AG, zurückzusenden.

14. LITERATUR










Hildebrand P, Königschulte W, Gaber TJ, Bubenzer-Busch S, Helmbold K, Biskup CS, Langen KJ, Fink GR, Zepf, FD: Effects of dietary tryptophan and phenylalanine-tyrosine depletion on phasic alertness in healthy adults - A pilot study. *Food & nutrition research*. 2015;**59**:26407

Moore P, Landolt HP, Seifritz E, Clark C, Bhatti T, Kelsoe J, Rapaport M, Gillin JC: Clinical and physiological consequences of rapid tryptophan depletion. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2000;**23**(6):601-622. doi:10.1016/S0893-133X(00)00161-5

Ormstad H, Dahl J, Verkerk R, Andreassen OA, Maes M: Increased plasma levels of competing amino acids, rather than lowered plasma tryptophan levels, are associated with a non-response to treatment in major depression. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2016. doi:10.1016/j.euroneuro.2016.05.005.

Toker L, Amar S, Bersudsky Y, Benjamin J, Klein E: The biology of tryptophan depletion and mood disorders. *The Israel journal of psychiatry and related sciences*. 2010;**47**(1):46-55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686199>.

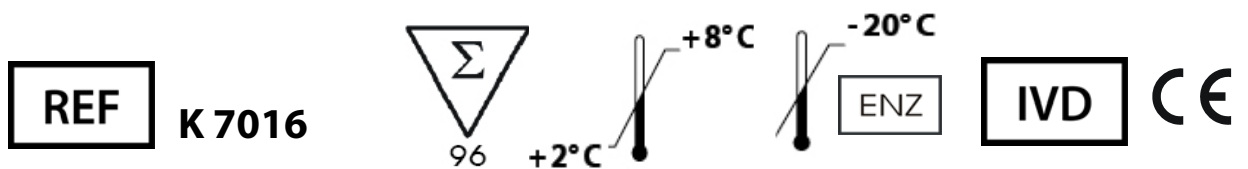
Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		

BCAA Kit

For the in vitro determination of L-leucine, L-isoleucine and L-valine in EDTA plasma and serum

Gültig ab / Valid from 2016-07-06



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. MATERIAL SUPPLIED	15
3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES	16
6. ASSAY PROCEDURE	16
<i>Principle of the test</i>	16
<i>Test procedure</i>	17
7. RESULTS	18
8. LIMITATIONS	18
9. QUALITY CONTROL	19
<i>Reference Range</i>	19
10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	19
<i>Precision and reproducibility</i>	19
<i>Spiking recovery</i>	20
<i>Dilution recovery</i>	21
<i>Analytical sensitivity</i>	22
<i>Specificity</i>	22
11. PRECAUTIONS	22
12. TECHNICAL HINTS	22
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
14. REFERENCES	23

1. INTENDED USE

This enzyme test is intended for the determination of branched-chain amino acids (L-leucine, L-isoleucine, L-valine) in EDTA plasma and serum. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
K 7016	PLATE	Microtiter plate	12 x 8 wells
K 7016	STD	Standards, lyophilized (0, 100, 300, 1000 µmol/l)	4 x 1 vial
K 7016	CTRL 1	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 7016	CTRL 2	Control, lyophilized (see specification for range)	2 x 1 vial
K 7016	ASYBUF	Assay buffer, ready to use	16 ml
K 7016	REABUF	Reaction buffer, lyophilized	2 x 1 vial
K 7016	ENZ	Leucine dehydrogenase, concentrate	2 x 1 vial

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Centrifuge, 3000 x g
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 340 nm

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥18.2 MΩ cm).

4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- Reconstitute the lyophilized **Standards (STD) and controls (CTRL1, CTRL2)** with **2.5 ml** of **ultra pure water**, mix well. The dissolved standards and controls can be stored at **-20°C**. Re-freeze immediately after use.
- Dissolve the content of one vial of **reaction buffer (REABUF)** in **3.0 ml** of **ultra pure water**, mix well. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. The dissolved reaction buffer can be stored at **-20°C** for **6 months**.
- The enzyme **leucine dehydrogenase (ENZ)** is stored at **-20 °C**. Before use add **2.4 ml** of **assay buffer (ASYBUF)** to the content of one vial of ENZ and mix well. When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. The diluted ENZ can be stored at **-20°C** for **6 months**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8 °C**.

5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES

EDTA plasma and serum

- Samples are stable for 48 h at 2-8°C. For longer storage keep samples frozen at -20°C.
- Samples are analyzed **undiluted**.

6. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This assay is a photometric test intended for the determination of leucine, isoleucine and valine by enzymatic dehydration, in which NAD⁺ is transformed to NADH.

In this reaction the amino acids L-leucine, L-isoleucine, L-valine are oxidized to the respective α -ketone bodies by reducing NAD^+ to NADH. This reaction can be measured at 340 nm and it is proportional to the amount of oxidized BCAA.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15-30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/ controls/ samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from the kit. Store unused strips covered at 2-8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Add 2 x 25 μl of standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE) into the respective wells of the microtiter plate (PLATE).
2.	Add 100 μl of ultra pure water into each well.
3.	Add 50 μl of assay buffer (ASYBUF) into each well.
4.	Add 50 μl of reaction buffer (REABUF) into each well and determine absorption immediately with an ELISA reader at 340 nm (OD_{BLANK}) .
5.	Add 50 μl of diluted leucine dehydrogenase (ENZ) into each well. Cover plate tightly.
6.	Incubate for 60 minutes at room temperature .
7.	Determine absorption at 340 nm (OD_{SAMPLE}) .
8.	For analysis of obtained data see chapter 9 "results".

7. RESULTS

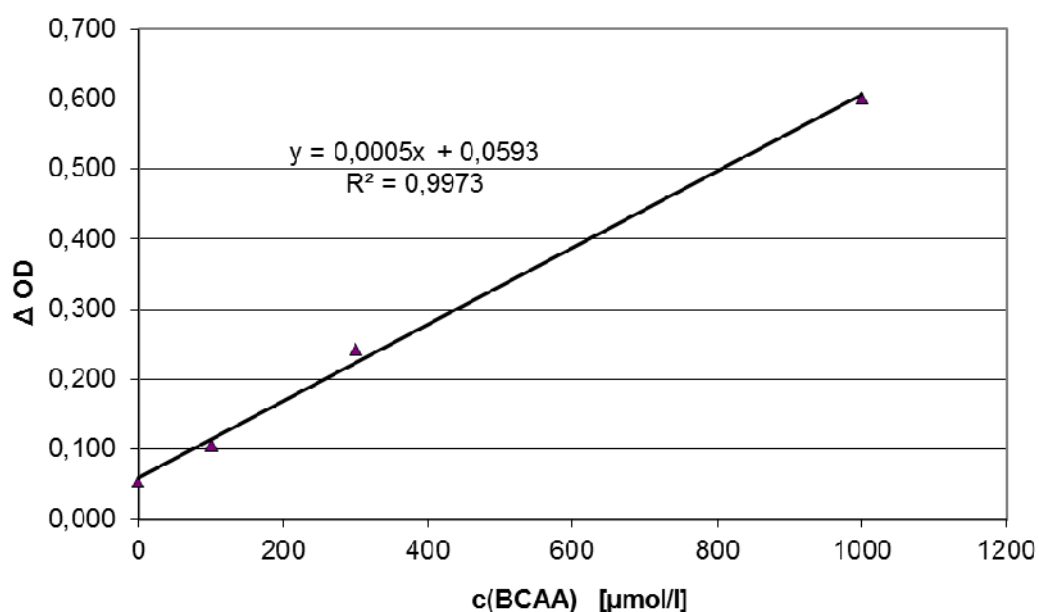
For calculation of results subtract OD values of the blank (OD_{BLANK}) from OD values after the addition of enzyme (OD_{SAMPLE}):

$$\Delta OD = OD_{\text{SAMPLE}} - OD_{\text{BLANK}}$$

To generate a standard curve, ΔOD of the standards are plotted against the standard concentrations. With the obtained slope and y-intercept BCAA concentrations of the samples can be calculated:

$$\text{BCAA } [\mu\text{mol/l}] = \frac{\Delta OD - \text{intercept}}{\text{slope}}$$

In the following, an example of a calibration curve is given; do not use it for the calculation of your results.



8. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard should be diluted with ultra pure water and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

9. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analyzed with each run. Results generated from the analysis of control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control samples are outside of the acceptable limits.

Reference Range

Based on internal studies with plasma samples of evidently healthy persons (n = 146) a mean value of 460 µmol/l was calculated. The standard deviation was 110.5 µmol/l.

Plasma mean value ± 2 × standard deviation: **460 ± 221 µmol/l**
Normal range: **239 – 681 µmol/l**

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Serum

Intra assay (n = 6)

sample	BCAA [µmol/l]	CV [%]
1	448	5.5
2	382	4.2

Inter assay (n = 6)

sample	BCAA [µmol/l]	CV [%]
1	465	3.7
2	193	8.9
3	425	6.6
4	171	8.0

EDTA plasma

Intra assay (n = 6)

sample	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	453	9.3
2	1337	2.6

Inter assay (n = 6)

sample	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	CV [%]
1	1627	3.1
2	828	3.6
3	1418	4.1
4	706	4.0

Spiking recovery

Two plasma and serum samples were spiked with different BCAA concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate was 93.8 % for EDTA plasma and 94.3 % for serum (n = 2).

EDTA plasma

sample	spike [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA expected [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
A			577	
	1500	1039	952	91.7
	3000	1789	1665	93.1
B			441	
	1500	970	895	92.2
	3000	1720	1691	98.2

Serum

sample	spike [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA expected [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
A			387	
	1500	944	938	99.4
	3000	1694	1551	91.6
B			453	
	1500	977	901	92.2
	3000	1727	1625	94.1

Dilution recovery

Two serum and plasma samples were diluted with ultra pure water and measured in this assay. The mean recovery rate was 95,4 % for EDTA plasma and 88.1 % for serum (n = 2).

EDTA plasma

sample	dilution	BCAA expected [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
A			577	
	1:2	289	266	92.1
B			1590	
	1:2	795	785	100.0

Serum

sample	dilution	BCAA expected [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
A			167	
	1:2	194	266	87.6
B			201	
	1:2	227	785	88.6

Analytical sensitivity

STD 1 (zero-standard) was measured 14 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 \text{ SD}$ and estimated to be 5.8 $\mu\text{mol/l}$.

Sample	mean value [OD]	2 x standard deviation (SD)	Detection limit [$\mu\text{mol/l}$]
STD 1	0.06	0.0023	5.8

Specificity

Specificity was tested by measuring the cross-reactivity against compounds with structural similarity to kynurenic acid. No cross reactivity with L-methionin was found.

11. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes
- The stop solution consists of sulfuric acid, which is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

12. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control Samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.

- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

14. REFERENCES










Hildebrand P, Königshulte W, Gaber TJ, Bubenzer-Busch S, Helmbold K, Biskup CS, Langen KJ, Fink GR, Zepf, FD: Effects of dietary tryptophan and phenylalanine-tyrosine depletion on phasic alertness in healthy adults - A pilot study. *Food & nutrition research*. 2015;**59**:26407

Moore P, Landolt HP, Seifritz E, Clark C, Bhatti T, Kelsoe J, Rapaport M, Gillin JC: Clinical and physiological consequences of rapid tryptophan depletion. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2000;**23**(6):601-622. doi:10.1016/S0893-133X(00)00161-5

Ormstad H, Dahl J, Verkerk R, Andreassen OA, Maes M: Increased plasma levels of competing amino acids, rather than lowered plasma tryptophan levels, are associated with a non-response to treatment in major depression. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2016. doi:10.1016/j.euroneuro.2016.05.005.

Toker L, Amar S, Bersudsky Y, Benjamin J, Klein E: The biology of tryptophan depletion and mood disorders. *The Israel journal of psychiatry and related sciences*. 2010;**47**(1):46-55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686199>.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		