

Arbeitsanleitung / Manual

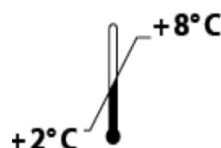
# GABA ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von GABA in Urin*

*For the in vitro determination of GABA in urine*

Gültig ab / Valid from 2023-03-01

**REF** K 7012



**IVD** **CE**



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

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>3</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>4</b>
<i>Testprinzip</i>	4
<i>Pipettierschema Derivatisierung</i>	5
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	6
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>7</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>8</b>
<i>Biotininterferenz</i>	8
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>8</b>
<i>Referenzwerte</i>	8
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>9</b>
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	9
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	9
<i>Linearität</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Analytische Spezifität</i>	11
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>11</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>12</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>12</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>13</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der GABA (Urin) ELISA ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) zum quantitativen Nachweis der Konzentration von freier Gamma-Aminobuttersäure (GABA) in Urin.

Der Assay ist ein *in-vitro* diagnostischer Test zur Verwendung durch professionelle Anwender in einer Laborumgebung. Er kann manuell oder mit einer automatisierten Plattform verwendet werden.

Der Test dient als Hilfsmittel zur Diagnose einer verminderten GABA-Konzentration im Urin.

## 2. EINLEITUNG

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist der mengenmäßig größte und wichtigste hemmende Neurotransmitter im Zentralnervensystem. Er wirkt den erregenden Katecholaminen entgegen und dämpft ebenso die endokrine Stressantwort. GABA stabilisiert den Blutdruck, reguliert den Appetit, wirkt angstlösend und schlaffördernd<sup>[1]</sup>. GABA wird aus Glutaminsäure synthetisiert, einer nicht essenziellen Aminosäure, die ihrerseits als erregender Neurotransmitter im Zentralnervensystem fungiert und auch als Gegenspieler von GABA zu betrachten ist.

Von klinischem Interesse sind sehr niedrige GABA-Konzentrationen, die bei Depressionen<sup>[2,3]</sup>, Autismus<sup>[4]</sup> oder Bluthochdruck<sup>[5]</sup> auftreten können.

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7012	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7012	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 0,3; 1; 3; 10; 30 $\mu$ mol/l)	6 x 500 $\mu$ l
K 7012	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 $\mu$ l
K 7012	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 $\mu$ l
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7012	AB	GABA-Antikörper, peroxidase markiert, gebrauchsfertig	1 x 6 ml

K 7012	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 70 ml
K 7012	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	1 vial
K 0008.10	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 10 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

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

#### 4. 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
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

\* 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).

#### 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehaltes im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das bei **2-8 °C** gelagerte **WASHBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2-8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

- **DMSO** kristallisiert bei 2-8 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO auf Raumtemperatur bringen, um die Kristalle zu lösen.
- Das **lyophilisierte Derivatisierungsreagenz (DER)** ist, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor dem Öffnen auf Raumtemperatur bringen. Zum Rekonstituieren die auf dem Etikett angegebene Menge an **DMSO** zugeben und mit dem Vortex-Mixer mehrere Sekunden mischen, **15 min** stehen lassen und zwischendurch vortexen. Das **Derivatisierungsreagenz** (gelöstes DER) ist **2 Monate bei 2-8 °C** haltbar. Das Derivatisierungsreagenz vor dem erneuten Gebrauch wieder auf Raumtemperatur bringen. Bitte beachten: DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Im Urin ist GABA vier Tage bei 2-8°C oder 72 h bei Raumtemperatur stabil. Die Urinprobe kann daher ungekühlt versendet werden. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden. Wir empfehlen ein Ansäuern der Urinproben.

Die Urinproben werden für die Derivatisierung **vorverdünnt** (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

Zur weiteren Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen GABA versetzt (siehe Pipettierschema Derivatisierung)

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von GABA aus Urin. Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zur Vorbereitung werden Standards, Kontrollen und verdünnte Proben mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen GABA versetzt. Anschließend werden in einer mit GABA-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte die derivatisierten Proben zusammen mit einem peroxidase markierten polyklonalen GABA-Antikörper inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper.

Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender GABA-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Um die ELISA-Ergebnisse auf die Kreatinin-Konzentration in den Proben zu normieren, ist eine parallele Bestimmung der Kreatinin-Konzentration erforderlich.

### *Pipettierschema Derivatisierung*

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

Die Urinproben werden im **Faktor 1:3** mit Reaktionspuffer wie folgt verdünnt:

**50 µl** Probe + **100 µl** Reaktionspuffer (REABUF), gut mischen.

Die Derivatisierung der Standards, der Kontrollen und der verdünnten Proben wird in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen) durchgeführt.

Wir empfehlen, pro Standard, Kontrolle und Probe je eine Derivatisierung durchzuführen und diese jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Mikrotiterplatte aufzutragen.

1.	Jeweils <b>25 µl Standard</b> (STD)/ <b>Kontrolle</b> (CTRL)/ <b>verdünnte Probe</b> in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.
2.	<b>500 µl Reaktionspuffer</b> (REABUF) in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren.
3.	<b>50 µl Derivatisierungsreagenz</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und <b>gründlich mischen</b> durch mehrmaliges Umdrehen oder mehrere Sekunden Vortexen.
4.	<b>30 min</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) auf einem <b>Horizontalschüttler</b> inkubieren.

2 x 50 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

### *Pipettierschema Testdurchführung*

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

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

5.	<b>2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben</b> aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
6.	<b>50 µl GABA-Antikörper (AB)</b> in jede Vertiefung pipettieren.
7.	Platte mit Folie dicht abkleben und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15-30°C) <b>unter Schütteln</b> inkubieren.
8.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	<b>100 µl Substrat (SUB)</b> in jede Vertiefung pipettieren.
10.	<b>8-12 min*</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) im <b>Dunkeln</b> inkubieren.
11.	<b>100 µl Stopplösung (STOP)</b> in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
12.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

\* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Auf folgende Punkte ist zu achten:



Eine Derivatisierung der Proben ist sowohl in 30 Minuten auf einem Horizontal-schüttler als auch, nach sorgfältigem Durchmischen, in 90 Minuten ohne Schütteln in einem Automaten möglich. Bei automatisierter Abarbeitung dürfen unter Wahrung der jeweiligen Verdünnungen die Volumina von Proben und Verdünnern skaliert werden. Gerätespezifische Minimal- und Maximalvolumina sind zu beachten. Die Homogenität der resultierenden Verdünnung ist zu gewährleisten.

Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

## 8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

### 1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z.B. 0,001).

### 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

### 3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

### Urinproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 3** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein anderer Verdünnungsfaktor verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs können mit Reaktionspuffer stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*höchste Konzentration der Standardkurve* × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*analytische Sensitivität* × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

### *Biotininterferenz*

Proben, die Biotin in einer Konzentration von  $\leq 743$  ng/ml enthalten, zeigen eine Veränderung der Ergebnisse von  $< 25$  %. Höhere Biotinkonzentrationen können zu falschen Ergebnissen führen. Bei Patienten, die  $> 5$  mg/Tag Biotin einnehmen, sollte die Probeentnahme frühestens 24 Stunden nach der letzten Applikation erfolgen. Ergebnisse für Patienten, die Biotinpräparate einnehmen oder eine hochdosierte Biotintherapie erhalten, sollten grundsätzlich vorsichtig und im Zusammenhang mit dem gesamten klinischen Bild interpretiert werden.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### *Referenzwerte*

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich gesunden Personen ( $n = 40$ ) wurde ein Median von  $3,2 \mu\text{mol/g}_{\text{Krea}}$  ermittelt, die 10. Perzentile lag bei  $2,0 \mu\text{mol/g}_{\text{Krea}}$ . Daraus ergibt sich folgender Normbereich:

GABA-Konzentration in Urin:  $> 2,0 \mu\text{mol/g}_{\text{Krea}}$

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Genauigkeit – Präzision*

#### **Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 16**

Die Wiederholbarkeit wurde mit 4 Proben unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ $\mu\text{mol/l}$ ]	VK [%]
1	13,2	5,2
2	23,6	4,5
3	37,9	5,2
4	51,4	7,1

#### **Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 8**

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 4 Proben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ $\mu\text{mol/l}$ ]	VK [%]
1	12,2	11,4
2	20,8	8,5
3	31,2	7,4
4	41,3	9,1

### *Genauigkeit – Richtigkeit*

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Dafür wurden 3 verschiedene Proben mit 3 weiteren Proben versetzt (Spike) und gemessen. Die erwarteten Werte resultieren aus dem Mittel von Probe und Spike.

Probe [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{mol/l}$ ]	erwartet [ $\mu\text{mol/l}$ ]	gemessen [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Wiederfindung [%]
23,3	4,9	14,1	15,9	112,7
	9,0	16,2	16,9	104,4
	13,6	18,5	19,2	104,0
36,3	4,9	20,6	22,0	106,7
	9,0	22,7	23,5	103,7
	13,6	24,9	23,3	93,4
48,7	4,9	26,8	27,6	102,8
	9,0	28,9	29,2	101,1
	13,6	31,2	31,9	102,2

## Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung von 4 Urinproben nachgewiesen.

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Für GABA in Urin wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 1,5 bis 18,2 µg/ml nachgewiesen mit einer Wiederfindung von 97,4 bis 118,3 % in diesem Bereich.

Probe [µmol/l]	Verdünnung	erwartet [µmol/l]	gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
A	1:3		5,0	
	1:4	3,7	4,0	108,0
	1:6	2,5	2,8	112,2
	1:8	1,9	2,0	107,4
	1:10	1,5	1,6	109,9
B	1:3		8,9	
	1:4	6,7	7,2	107,4
	1:6	4,5	4,9	109,1
	1:8	3,4	3,7	111,5
	1:10	2,7	3,0	111,5
C	1:3		13,6	
	1:4	10,2	11,2	110,5
	1:6	6,8	7,3	107,5
	1:8	5,1	5,7	111,1
	1:10	4,1	4,8	118,3
D	1:3		18,2	
	1:4	13,7	13,3	97,4
	1:6	9,1	9,1	100,2
	1:8	6,8	7,0	102,0
	1:10	5,5	6,1	111,1

## Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 - 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 48-mal der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 0,27 µmol/l.

### *Analytische Spezifität*

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die GABA-Reaktivität:

β-Alanin	< 0,14 %
β-Aminobuttersäure	keine Kreuzreaktivität nachgewiesen
α-Aminobuttersäure	keine Kreuzreaktivität nachgewiesen
Glycin	keine Kreuzreaktivität nachgewiesen
Glutamin	keine Kreuzreaktivität nachgewiesen

## 12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

**Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

### **13. 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 auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums 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 dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

















### **14. 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 Immundiagnostik 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 Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

## 15. LITERATUR

1. Lydiard RB. The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry*. 2003;64 Suppl 3:21-7. PMID: 12662130.
2. Wang L, Yang P, Yang C, Yang D, Wu X, Cao T, Zeng C, Chen Q, Zhang S, Zhu Z, Jiao S, Cai H. Disturbance of neurotransmitter metabolism in drug-naïve, first-episode major depressive disorder: a comparative study on adult and adolescent cohorts. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2022 Apr 11. doi: 10.1007/s00406-022-01406-8. Epub ahead of print. PMID: 35410391.
3. Shutta KH, Balasubramanian R, Huang T, Jha SC, Zeleznik OA, Kroenke CH, Tinker LF, Smoller JW, Casanova R, Tworoger SS, Manson JE, Clish CB, Rexrode KM, Hankinson SE, Kubzansky LD. Plasma metabolomic profiles associated with chronic distress in women. *Psychoneuroendocrinology*. 2021 Nov;133:105420. doi: 10.1016/j.psyneuen.2021.105420. Epub 2021 Sep 20. PMID: 34597898; PMCID: PMC8547060.
4. Gevi F, Belardo A, Zolla L. A metabolomics approach to investigate urine levels of neurotransmitters and related metabolites in autistic children. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 Oct 1;1866(10):165859. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165859. Epub 2020 Jun 5. PMID: 32512190.
5. Kawakami K, Yamada K, Yamada T, Nabika T, Nomura M. Antihypertensive Effect of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid-Enriched Brown Rice on Spontaneously Hypertensive Rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2018;64(1):56-62. doi: 10.3177/jnsv.64.56. PMID: 29491273.

**Verwendete Symbole:**

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmoderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	Herstellungskennung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs



Manual

# GABA ELISA

*For the in vitro determination of GABA in urine*

Valid from 2023-03-01



**K 7012**



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

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>17</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>18</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>19</b>
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>19</b>
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Derivatisation procedure</i>	20
<i>Test procedure</i>	20
<b>8. RESULTS</b>	<b>21</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>22</b>
<i>Biotin interference</i>	22
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>22</b>
<i>Reference range</i>	23
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>23</b>
<i>Accuracy – Precision</i>	23
<i>Accuracy – Trueness</i>	23
<i>Linearity</i>	24
<i>Analytical sensitivity</i>	25
<i>Analytical specificity</i>	25
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>25</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>26</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>26</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>27</b>

## 1. INTENDED USE

The GABA (urine) ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative detection of the concentration of free gamma-aminobutyric acid (GABA) in urine.

The assay is an *in vitro* diagnostic medical device and intended to be used by professional users in a laboratory environment. It can be performed manually or using an automated platform.

The test serves as an aid to diagnosis of a reduced GABA concentration in urine.

## 2. INTRODUCTION

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the most prevalent and most important inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. It counteracts the excitatory catecholamines and likewise attenuates the endocrine stress response. GABA stabilises blood pressure, regulates appetite, has anxiolytic and sleep-inducing effects <sup>[1]</sup>. It is synthesised from glutamic acid, a non-essential amino acid, which in turn functions as an excitatory neurotransmitter in the central nervous system and can also be considered as an antagonist of GABA.

Of clinical interest are very low GABA concentrations found in depression <sup>[2,3]</sup>, autism <sup>[4]</sup>, or hypertension <sup>[5]</sup>.

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit Components	Quantity
K 7012	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 7012	STD	Standards, ready-to-use (0, 0.3, 1, 3, 10, 30 µmol/l)	6 x 500 µl
K 7012	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 500 µl
K 7012	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 500 µl
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 7012	AB	GABA antibody, peroxidase-labelled, ready-to-use	1 x 6 ml
K 7012	REABUF	Reaction buffer, ready-to-use	1 x 70 ml
K 7012	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	1 vial

K 0008.10	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 10 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

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

#### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water\*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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).

#### 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2-8 °C for 1 month**.
- **DMSO** crystallises at 2-8 °C. Before use, bring to room temperature to dissolve the crystals.
- The **lyophilised derivatisation reagent (DER)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. Bring to room temperature before opening and dissolve the content of the vial in **DMSO** as stated on the label. Allow to dissolve for **15 min** and mix thoroughly with a vortex-mixer. The **derivatisation reagent** (reconstituted DER) can be stored at **2-8 °C for**

**2 months.** Bring to room temperature before reuse. Please note: DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.

- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

In urine, GABA is stable for 4 days at 2-8°C or for 72 h at room temperature. For longer storage keep frozen at -20°C. We recommend acidifying the urine samples.

Urine samples are **diluted** for derivatisation (see derivatisation procedure).

For sample preparation, a derivatisation reagent for derivatisation of GABA is added (see derivatisation procedure).

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed for the quantitative determination of GABA in urine. This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays.

The sample preparation includes the addition of a derivatisation reagent for GABA derivatisation. Afterwards, the treated samples and a peroxidase-conjugated polyclonal GABA antibody are incubated in wells of a microtiter plate coated with GABA derivative (tracer). During the incubation period, the target GABA in the sample competes with the tracer, immobilised on the wall of the microtiter wells, for the binding of the polyclonal antibodies.

After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The colour changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour is inverse proportional to the GABA concentration in the sample; this means, high GABA concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibody and lowers the photometric signal. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standards. GABA, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

To normalise the ELISA results to the creatinine concentration in the samples, a parallel determination of the creatinine concentration is required.

### *Derivatisation procedure*

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

Dilute the urine samples **1:3** with reaction buffer as follows:

**50 µl** sample + **100 µl** reaction buffer (REABUF), mix well.

Derivatisation of standards, controls, and diluted samples is carried out in reaction vials (e.g. 1.5 ml polypropylene vials).

We recommend preparing one derivatisation per standard, control and sample and transferring it in duplicate determinations into the wells of the microtiter plate.

1.	Add <b>25 µl standard</b> (STD)/ <b>control</b> (CTRL)/ <b>diluted sample</b> into the respective vials.
2.	Add <b>500 µl reaction buffer</b> (REABUF) into each vial (STD, CTRL, sample).
3.	Add <b>50 µl derivatisation reagent</b> into each vial (STD, CTRL, sample) and <b>mix thoroughly</b> by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer.
4.	Incubate for <b>30 min</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .

2 x 50 µl of the derivatised standards, controls and samples are used in the ELISA as duplicates.

### *Test procedure*

Mark the positions of standards/controls/samples in duplicate on a protocol sheet. Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from the kit. Store unused strips covered with foil at 2-8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

5.	For the analysis in duplicate take <b>2 x 50 µl</b> of the <b>derivatised standards/ controls/ samples</b> out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.
6.	Add <b>50 µl GABA antibody</b> (AB) into each well of the microtiter plate.
7.	Cover the strips tightly with foil and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .
8.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.

9.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.
10.	Incubate for <b>8-12 min*</b> at room temperature (15-30 °C) in the <b>dark</b> .
11.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.
12.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> against 620 nm (690 nm) as a reference.

\* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend to observe the colour change and to stop the reaction upon good differentiation.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. Attention should be paid to the following points:

Derivatisation of the samples is possible in 30 minutes on a horizontal shaker or, after thorough mixing, in 90 minutes without shaking in an automated processor. In automated processing, the volumes of samples and diluents may be scaled while maintaining the respective dilutions. Device-specific minimum and maximum volumes must be taken into account. The homogeneity of the resulting dilution must be ensured.

For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the 4 parameter algorithm.

### 1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

### 2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

### 3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the program used, the duplicate values should be evaluated manually.

### Urine samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 3** to get the actual concentrations.

In case another dilution factor has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range can be further diluted with reaction buffer and re-assayed. Please consider this higher dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

*highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used*

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

*analytical sensitivity × sample dilution factor to be used*

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

### *Biotin interference*

Samples containing a biotin concentration of  $\leq 743$  ng/ml show a change of the results of  $< 25$  %. Higher concentrations of biotin can lead to false results. Patients taking  $> 5$  mg biotin per day should wait at least 24 hours after taking biotin to have their samples collected. Results of patients taking biotin supplements or receiving a high-dose biotin therapy should generally be interpreted along with the total clinical picture.

## 10. QUALITY CONTROL

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

Control samples should be analysed 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 in-house studies with samples of apparently healthy persons, a median of  $3.2 \mu\text{mol/g}_{\text{crea}}$  was determined ( $n = 40$ ). The 10<sup>th</sup> percentile was  $2,0 \mu\text{mol/g}_{\text{crea}}$ , resulting in the following normal range:

GABA concentration in urine:  $> 2,0 \mu\text{mol/g}_{\text{crea}}$

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 16**

The repeatability was assessed with 4 samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

sample	mean value [ $\mu\text{mol/l}$ ]	CV [%]
1	13.2	5.2
2	23.6	4.5
3	37.9	5.2
4	51.4	7.1

#### **Reproducibility (Inter-Assay); n = 8**

The reproducibility was assessed with 4 samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

sample	mean value [ $\mu\text{mol/l}$ ]	CV [%]
1	12.2	11.4
2	20.8	8.5
3	31.2	7.4
4	41.3	9.1

### *Accuracy – Trueness*

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, 3 different samples (spikes) were added to 3 samples. The expected values result from the mean of sample and spike.

sample [ $\mu\text{mol/l}$ ]	spike [ $\mu\text{mol/l}$ ]	expected [ $\mu\text{mol/l}$ ]	obtained [ $\mu\text{mol/l}$ ]	recovery [%]
23.3	4.9	14.1	15.9	112.7
	9.0	16.2	16.9	104.4
	13.6	18.5	19.2	104.0
36.3	4.9	20.6	22.0	106.7
	9.0	22.7	23.5	103.7
	13.6	24.9	23.3	93.4
48.7	4.9	26.8	27.6	102.8
	9.0	28.9	29.2	101.1
	13.6	31.2	31.9	102.2

### Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed with a serial dilution of 4 urine samples.

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

For GABA in urine, the method has been demonstrated to be linear from 1.5 to 18.2  $\mu\text{g/ml}$ , showing a recovery rate of 97.4 – 118.3 % in this interval.

sample [ $\mu\text{mol/l}$ ]	dilution	expected [ $\mu\text{mol/l}$ ]	obtained [ $\mu\text{mol/l}$ ]	recovery [%]
A	1:3		5.0	
	1:4	3.7	4.0	108.0
	1:6	2.5	2.8	112.2
	1:8	1.9	2.0	107.4
	1:10	1.5	1.6	109.9
B	1:3		8.9	
	1:4	6.7	7.2	107.4
	1:6	4.5	4.9	109.1
	1:8	3.4	3.7	111.5
	1:10	2.7	3.0	111.5
C	1:3		13.6	
	1:4	10.2	11.2	110.5
	1:6	6.8	7.3	107.5
	1:8	5.1	5.7	111.1
	1:10	4.1	4.8	118.3

D	1:3		18.2	
	1:4	13.7	13.3	97.4
	1:6	9.1	9.1	100.2
	1:8	6.8	7.0	102.0
	1:10	5.5	6.1	111.1

### *Analytical sensitivity*

The zero standard was measured 48 times. The detection limit was set as  $B_0 - 2 \text{ SD}$  and estimated to be 0.27  $\mu\text{mol/l}$ .

### *Analytical specificity*

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to GABA. The specificity is calculated in percent in relation to the GABA-binding activity:

$\beta$ -alanine	< 0.14 %
$\beta$ -aminobutyric acid	no cross reactivity was observed
$\alpha$ -aminobutyric acid	no cross reactivity was observed
glycine	no cross reactivity was observed
glutamine	no cross reactivity was observed

## 12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

**Warning:** Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulfuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be

wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

### **13. 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 analysed 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.

















### **14. 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 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.

## 15. REFERENCES

1. Lydiard RB. The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry*. 2003;64 Suppl 3:21-7. PMID: 12662130.
2. Wang L, Yang P, Yang C, Yang D, Wu X, Cao T, Zeng C, Chen Q, Zhang S, Zhu Z, Jiao S, Cai H. Disturbance of neurotransmitter metabolism in drug-naïve, first-episode major depressive disorder: a comparative study on adult and adolescent cohorts. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2022 Apr 11. doi: 10.1007/s00406-022-01406-8. Epub ahead of print. PMID: 35410391.
3. Shutta KH, Balasubramanian R, Huang T, Jha SC, Zeleznik OA, Kroenke CH, Tinker LF, Smoller JW, Casanova R, Tworoger SS, Manson JE, Clish CB, Rexrode KM, Hankinson SE, Kubzansky LD. Plasma metabolomic profiles associated with chronic distress in women. *Psychoneuroendocrinology*. 2021 Nov;133:105420. doi: 10.1016/j.psyneuen.2021.105420. Epub 2021 Sep 20. PMID: 34597898; PMCID: PMC8547060.
4. Gevi F, Belardo A, Zolla L. A metabolomics approach to investigate urine levels of neurotransmitters and related metabolites in autistic children. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 Oct 1;1866(10):165859. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165859. Epub 2020 Jun 5. PMID: 32512190.
5. Kawakami K, Yamada K, Yamada T, Nabika T, Nomura M. Antihypertensive Effect of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid-Enriched Brown Rice on Spontaneously Hypertensive Rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2018;64(1):56-62. doi: 10.3177/jnsv.64.56. PMID: 29491273.

**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
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin