

Arbeitsanleitung / Manual

Glutamat Kit

Zur Bestimmung von Glutamat in humanem EDTA-Plasma und
Serum

Glutamate Kit

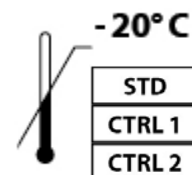
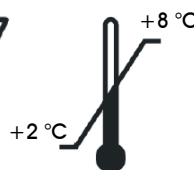
For the determination of glutamate in human EDTA plasma and
serum

Nur zu Forschungszwecken / For research use only

Gültig ab / Valid from 09.06.2010



K 7731



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis / Table of content	Seite /page
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
PIPETTIERSHEMA TESTDURCHFÜHRUNG	7
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	8
ERWARTETE ERGEBNISSE	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	9
SENSITIVITÄT	10
WIEDERFINDUNG	10
LINEARITÄT	11
12. EINSCHRÄNKUNGEN	11
13. LITERATUR	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

1. INTENDED USE	14
2. INTRODUCTION	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	15
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
7. PRECAUTIONS	16
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	17
9. ASSAY PROCEDURE	17
TEST PROCEDURE	18
10. EVALUATION OF RESULTS	19
EXPECTED VALUES	19
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	20
SENSITIVITY	21
RECOVERY	21
LINEARITY	22
12. LIMITATIONS	22
13. REFERENCES	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser Enzym-Test ist für die Bestimmung von Glutamat in humanem EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zu Forschungszwecken.

2. EINLEITUNG

Glutamat (L-Glutaminsäure) ist eine nicht essentielle Aminosäure und kommt im menschlichen Körper, wie alle Aminosäuren, als L-Isomer vor. L-Glutaminsäure spielt eine wesentliche Rolle im Zellstoffwechsel, da sie über den Citratzyklus in Verbindung zum Kohlenhydratstoffwechsel steht. Die Prozesse im Citratzyklus dienen der Entgiftung aller Gewebe, da das L-Glutamat das beim Protein- und Aminosäureabbau freiwerdende Zellgift Ammoniak unter Bildung von Glutamin bindet.

Über seine Eigenschaft als NH_2 -Donor ist L-Glutamat sowohl an der Bildung von Aminosäuren beteiligt wie auch am Abbau.

Weiterhin ist L-Glutamat der wichtigste erregende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem der Säugetiere. Es wird synaptisch freigesetzt und bindet im Gehirn an spezifische Glutamat-Rezeptoren.

Durch das Enzym L-Glutaminsäuredecarboxylase wird L-Glutaminsäure im zentralen Nervensystem zu γ -Aminobuttersäure (GABA), einem weiteren Neurotransmitter, decarboxyliert. L-Glutaminsäure ist die einzige Aminosäure, die im Gehirn oxidiert, transaminiert, aminiert und decarboxyliert wird.

Es wird angenommen, dass L-Glutamat auch beim Lern- und Erinnerungsvermögen involviert ist und bei Krankheiten wie amyotropher Lateralsklerose (ALS), Lathyrismus, Autismus, geistiger Retardierung und Alzheimer eine Rolle spielt.

L-Glutamat ist außerdem in einer Vielzahl von Lebensmitteln enthalten und wird als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie eingesetzt.

3. TESTPRINZIP

Es handelt sich bei dem vorliegenden Test um einen photometrischen Test zur Bestimmung von L-Glutamat über eine enzymatische Dehydrierung, bei der NAD^+ zu NADH überführt wird.

Bei der Reaktion wird L-Glutamat zu α -Ketoglutarat umgesetzt, wobei NAD^+ zu NADH reduziert wird. Diese Übertragungsreaktion kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden und ist proportional zum oxidierten L-Glutamat.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K7731MTP	PLATE	Mikrotiterplatte	12 x 8 Vertiefungen
K7731ST	STD	Standards	2 x 1 Fläschchen
K7731KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen	2 x 1 Fläschchen
K7731AB	ASYBUF	Assaypuffer	16 ml
K7731RB	REABUF	Reaktionspuffer	2 x 1 Fläschchen
K7731EB	ENZ B	Glutamat-Dehydrogenase	2 x 1 Fläschchen

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 μl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 10000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 340 nm
- Wärmeschrank 37°C

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte 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 je nach Probenaufkommen bis zu 2 x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL)** sind lyophilisiert und werden in jeweils 300 µl bidestilliertem Wasser rekonstituiert. Nach Gebrauch können die Standards und die Kontrollen bei -20°C gelagert und bis zu 2 Mal wieder aufgetaut werden. Das Wiedereinfrieren der Standards und Kontrollen sollte sofort nach Entnahme erfolgen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Reaktionspuffer (REABUF)** wird vor Gebrauch in **3 ml bidestilliertem Wasser (aqua bidest.)** gelöst und gut gemischt. Durch die Aufteilung des REABUF in 2 Gefäße ist der Enzymtest in zwei Ansätze teilbar.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Glutamat-Dehydrogenase (ENZ B)** wird mit **2,6 ml Assaypuffer (ASYBUF)** aufgefüllt und gut gemischt. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die Aufteilung des ENZ B in 2 Gefäße ist der Enzymtest in zwei Ansätze teilbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei 2-8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zu Forschungszwecken.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

EDTA-Plasma und Serum

- Als Probe eignet sich venöses Nüchternblut. Die Haltbarkeit der frischen Probe ist sehr begrenzt, sie sollte bei 2-8°C gelagert und innerhalb 48 h gemessen werden. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20°C aufbewahrt werden.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- Falls weniger als 50 µl Probe vorhanden ist, empfehlen wir eine 1:2 Verdünnung in bidestilliertem Wasser (25 µl Probe + 25 µl aqua bidest.). Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.
- **Proben** mit sichtbaren Mengen an **Feststoff** (meist Kryoproteine) sollten vor Einsatz mind. 5 min bei 10000 x g **zentrifugiert** werden. Der resultierende Überstand wird im Test eingesetzt.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik AG übernimmt keine Haftung.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

Pipettierschema Testdurchführung

1. Positionen für Standard /Kontrollen /Probe (STD/CTRL/SAMPLE) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren.
2. Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bei Raumtemperatur gelagert werden.
3. 2 x 50 µl Standards (STD)/ Kontrollen (CTRL)/ Proben (SAMPLE) werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte (PLATE) pipettiert.
4. Jeweils 50 µl bidestilliertes Wasser in alle verwendeten Vertiefungen pipettieren.
5. 100 µl Assaypuffer (ASYBUF) in jede Vertiefung geben.
6. 50 µl Reaktionspuffer (REABUF) in jede Vertiefung geben und die Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 340 nm messen (OD _{BLANK}).
7. 50 µl Glutamat-Dehydrogenase (ENZ B) in alle Vertiefungen pipettieren. Streifen luftdicht abdecken.
8. 15 min bei 37°C inkubieren.
9. Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer bei 340 nm messen (OD _{SAMPLE}).
10. Die Auswertung der Rohdaten erfolgt wie unter Punkt 10 Auswertung beschrieben.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Bei einer Durchführung des Tests unter strikter Einhaltung der Volumenangaben für Standards, Kontrolle und Probenbehandlung sind Standards, Kontrollen sowie Proben gleich verdünnt, deshalb wird **bei der Auswertung der Ergebnisse kein Verdünnungsfaktor mit berechnet**.^{**}

^{**}Bei einer 1:2 Verdünnung muss der Verdünnungsfaktor 2 mit berechnet werden.

Die OD-Werte des Blank werden von den OD-Werten nach Enzymzugabe abgezogen. Δ OD der Standards wird gegen die Standard-Konzentrationen (siehe QC-Datenblatt) in einem Diagramm aufgetragen. Mittels der erhaltenen Steigung werden die Glutamat-Konzentrationen der Proben berechnet.

$$\text{Glutamat} = \frac{(OD_{\text{Sample}} - OD_{\text{Blank}}) - \text{Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}} \text{ } [\mu\text{mol/l}]$$

Erwartete Ergebnisse

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (**n=24**) wurde ein Mittelwert von 144 μM ermittelt, bei einer Standardabweichung von 34 $\mu\text{mol/l}$.

Serum/Plasma Mittelwert $\pm$ 2 Standardabweichungen: $144 \pm 68 \mu\text{mol/l}$

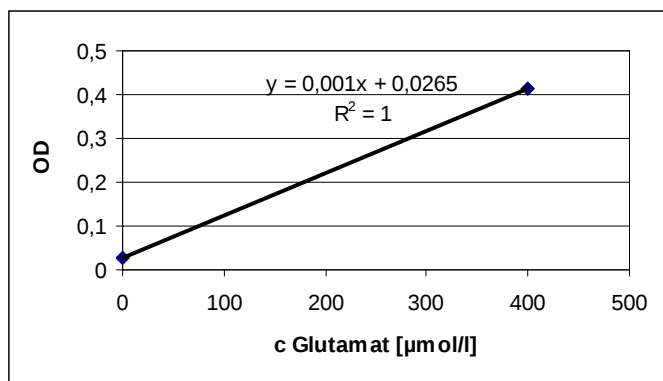
Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Testansatz Kontrollen mitgeführt werden. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen die Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

Die Konzentrationen der Kontrolle und der Patientenproben können direkt aus der Kalibrierkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.

Musterkalibrierkurve



11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=6)		
Probe	Glutamat [$\mu\text{mol/l}$]	Standardabweichung (SD) [%]
1	109,6	2,1
2	223,4	1,7

Inter-Assay (n=6)		
Probe	Glutamat [μmol/l]	Standardabweichung (SD) [%]
1	98,2	1,3
2	159,6	1,3

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 2 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 20 Mal der Standard Null.

Probe	Glutamat Mittelwert [OD]	2 Standard- abweichungen (2 x SD)[%]	Nachweis- grenze [μmol/l]
Standard Null	0,02	12,6	5,9

Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an Glutamat wurden zu einer Serumprobe gegeben (Spike) und anschließend im Enzymtest gemessen. Die analytische Wiederfindung von Glutamat wurde bei 2 verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die theoretisch erwarteten Werte wurden dabei aus der Summe der gemessenen Konzentration in der Probe ohne Spike und der zugegebenen Menge ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Serumprobe betrug 100,3 % (n=6).

Spike [μmol/l]	Glu erwartet [μmol/l]	Glu gemessen [μmol/l]	Wiederfindung [%]
0	x	x=100,7	100,0
25	100,7+50=150,7	152,6	101,3
50	100,7+100=200,7	200,1	99,7

Linearität

Die Linearität des Tests wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe bestimmt. Die mittlere Linearität betrug 97 %.

Verdünnung	Messwert [μmol/l]	Erwartet [μmol/l]	Wiederfindung [%]
original	100,7	100,7	100,0
1+1	49,6	50,4	98,4
1+3	23,3	25,2	92,5

12. EINSCHRÄNKUNGEN

Stark hämolytische oder lipämische Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Wir empfehlen solche Proben nicht zu analysieren.

13. LITERATUR

Ferrari A, Spaccapelo L, Pinetti D, Tacchi R, Bertolini A: Effective prophylactic treatments of migraine lower plasma glutamate levels. Cephalalgia. 2009 Apr; 29(4):423-9

Peres MF, Zukerman E, Senne Soares CA, Alonso EO, Santos BF, Faulhaber MH: Cerebrospinal fluid glutamate levels in chronic migraine. Cephalalgia. 2004 Sep; 24(9): 735-9

Castellanos M, et al: High plasma glutamate concentrations are associated with infarct growth in acute ischemic stroke. Neurology. 2008 Dec 2; 71(23): 1862-8

Castillo J, Martínez F, Corredera E, Aldrey JM, Noya M: Amino acid transmitters in patients with headache during the acute phase of cerebrovascular ischemic disease. Stroke. 1995 Nov; 26(11): 2035-9

Baad-Hansen L, Cairns BE, Ernberg M, Svensson P: Effect of systemic monosodium glutamate (MSG) on headache and pericranial muscle sensitivity. Cephalalgia. 2009 Apr 28

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden (Haltbarkeitsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettivolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

Glutamate Kit

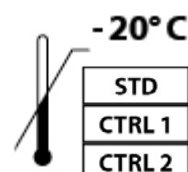
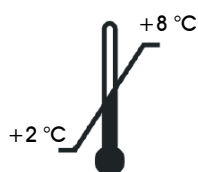
For the determination of glutamate in human EDTA plasma and serum

For research use only

Valid from 09.06.2010



K 7731



1. INTENDED USE

This enzyme test is intended for the determination of glutamate in human EDTA plasma and serum. It is for research use only.

2. INTRODUCTION

Glutamic acid is a non-essential amino acid. The salts of glutamic acid are known as glutamates. Glutamate plays a central role in cellular metabolism. A significant process in amino acid degradation is transamination, in which the amino group of an amino acid is transferred to an α -keto acid, typically catalyzed by a transaminase. A very common α -keto acid is α -ketoglutarate, an intermediate in the citric acid cycle. Vice versa, transamination of α -ketoglutarate gives glutamate. The resulting α -keto acid products pyruvate and oxaloacetate are key components in fundamental processes such as glycolysis, gluconeogenesis and also the citric acid cycle.

Glutamate also plays an important role in the body's disposal of excess or waste nitrogen. Glutamate undergoes deamination, an oxidative reaction catalyzed by glutamate dehydrogenase.

In the vertebrate nervous system Glutamate is the most abundant excitatory neurotransmitter. At chemical synapses it binds to glutamate receptors, such as the NMDA receptor. Because of its role in synaptic plasticity, glutamate is involved in cognitive functions like learning and memory in the brain.

Glutamate is rapidly removed from the extracellular space by Glutamate transporters in neuronal and glial membranes. In brain injury or disease, they can work in reverse and excess glutamate can accumulate outside cells, which leads to neuronal damage and eventual cell death. This excitotoxicity due to glutamate occurs as part of the ischemic cascade and is associated with stroke and diseases like amyotrophic lateral sclerosis, lathyrism, autism, some forms of mental retardation and Alzheimer's disease.

Moreover, in the brain Glutamate also serves as the precursor for the synthesis of the inhibitory neurotransmitter GABA in GABA-ergic neurons.

Free glutamic acid is present in a wide variety of foods and is often used as a food additive and flavour enhancer in the form of its sodium salt, monosodium glutamate.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This assay is a photometric test intended for the determination of L-glutamate by enzymatic dehydration, in which NAD^+ is transformed to NADH.

In this reaction L-glutamate is oxidized to α -ketoglutarate by reducing NAD^+ to NADH. This reaction can be measured at 340 nm and it is proportional to the amount of oxidized L-glutamate.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Content	Kit Components	Quantity
K7731MTP	PLATE	Microtiter plate	12 x 8 wells
K7731ST	STD	Standards	2 x 1 vial
K7731KO	CTRL 1 CTRL 2	Controls	2 x 1 vial
K7731AP	ASYBUF	Assay buffer	16 ml
K7731RP	REABUF	Reaction buffer	2 x 1 vial
K7731EB	ENZ B	Glutamate dehydrogenase	2 x 1 vial

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Double distilled water (aqua bidest.)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 μl
- Foil to cover the microtiter plate
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 10000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 340 nm
- Incubator 37°C

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 2 times within the expiry date stated on the label.
- **Standards (STD) and controls (CTRL1, CTRL2)** are lyophilized and must be reconstituted in **300 µl bidest. water**. After use standards and controls can be stored at -20°C and can be re-frozen up to 2 times. Re-freeze immediately after use.
- The content of one vial of **reaction buffer (REABUF)** must be dissolved in **3 ml bidest. water**, mix well. Discard any remaining quantity after use. By providing two REABUF vials the kit can be separated into two performances.
- To the content of one vial of **glutamate dehydrogenase (ENZ B) 2,6 ml assay buffer (ASYBUF)** must be added. Mix well. Discard any remaining quantity after use. By providing two ENZ B vials the kit can be separated into two performances.
- All other test reagents are stable until date of expiry (see label) when stored at 2-8°C.

7. PRECAUTIONS

- For research use only.
- Reagents should not be used beyond the expiry date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA plasma and serum

- Venous fasting blood is suited for this test system. As stability of fresh blood samples is very limited, they should be stored at 2-8°C and measured within 48 h. For longer storage samples should be stored frozen at -20°C.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- If less than 50 µl of sample is provided we recommend diluting the sample 1:2 in aqua dest. (25 µl sample + 25 µl aqua dest.). This dilution factor must be considered in data evaluation.
- **Samples** with visible amounts of **precipitates** should be **centrifuged** at least for 5 min at 10000 x g. The resulting supernatant is used in the assay.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure that are not coordinated with the producer may influence the test results. Immundiagnostik AG can therefore not be held reliable for any damage resulting from this.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

Test procedure

1.	Mark the positions of standards (STD) /controls (CTRL) / samples (SAMPLE) in duplicate on a protocol sheet
2.	Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at room temperature.
3.	Add 2 x 50 µl of standards (STD) / controls (CTRL) / samples (SAMPLE) into the respective well of the microtiter plate (PLATE)
4.	Add 50 µl of bidest. water into each well.
5.	Add 100 µl assay buffer (ASYBUF) into each well
6.	Add 50 µl reaction buffer (REABUF) into each well and determine absorption immediately with an ELISA reader at 340 nm (OD _{BLANK}).
7.	Add 50 µl diluted glutamate dehydrogenase (ENZ B) into each well. Cover plate tightly.
8.	Incubate at 37°C for 15 minutes .
9.	Determine absorption at 340 nm (OD _{SAMPLE}).
10.	For analysis of obtained data see chapter 10 “evaluation of results”.

10. EVALUATION OF RESULTS

If the test is performed in strict compliance with the manufacturer's instructions (i.e. with the exact volumes for standards, controls, and samples, and with correct sample treatment), standards, controls, and samples are equally diluted. Therefore, **no dilution factor is required for calculation of the results.** **

**If samples are diluted 1:2, the results must be multiplied by 2.

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

To generate a standard curve, ΔOD of the standards are plotted against the standard concentrations (see quality control protocol). With the obtained slope and y-intercept glutamate concentrations of the samples can be calculated:

$$\text{glutamate concentration} = \frac{(OD_{\text{Sample}} - OD_{\text{Blank}}) - \text{intercept}}{\text{slope}} \text{ } [\mu\text{mol/l}]$$

Expected values

Based on internal studies with serum samples of evidently healthy persons (**n=24**) a mean value of 144 $\mu\text{mol/l}$ was estimated. The standard variation was 34 $\mu\text{mol/l}$.

Normal range: mean value $\pm$ 2 $\times$ standard variation: 144 $\pm$ 68 $\mu\text{mol/l}$

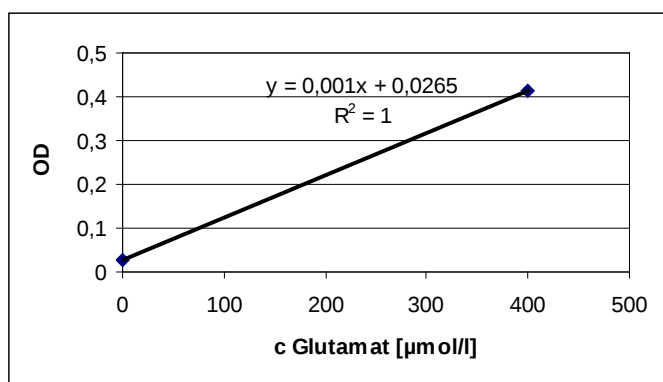
We recommend each laboratory to develop its own normal range. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

Controls

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 the acceptable limits.

The concentration of controls and patient samples can be determined directly from the calibration curve. In the following an example of a calibration curve is given.

Example of calibration curve



11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=6)		
Sample	Glutamate [µmol/l]	Standard variation (SD) [%]
1	109,6	2,1
2	223,4	1,7

Inter-Assay (n=6)		
Sample	Glutamate [μmol/l]	Standard variation (SD) [%]
1	98,2	1,3
2	15,6	1,3

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2SD$. The zero-standard was measured 20 times.

Sample	Glutamate mean value [OD]	2 x Standard variation (2 x SD) [%]	Detection limit [μmol/l]
0	0,02	12,6	5,9

Recovery

One sample was spiked with different glutamate concentrations and measured in this assay. The analytical recovery rate was determined by the expected and measured glutamate levels. The expected levels were calculated as the sum of the measured glutamate concentration in the original sample and the spiked glutamate amount. The mean recovery rate for all concentrations was 100,3 % (n=6).

Spike [μmol/l]	Glutamate expected [μmol/l]	Glutamate measured [μmol/l]	Recovery [%]
0	x	x=100,7	100,0
25	100,7+50=150,7	152,6	101,3
50	100,7+100=200,7	200,1	99,7

Linearity

Linearity of the test was determined by diluting a spiked patient sample. The mean linearity was 97 %.

Dilution	Measured [μmol/l]	Expected [μmol/l]	Recovery [%]
original	100,7	100,7	100,0
1+1	49,6	50,4	98,4
1+3	23,3	25,2	92,5

12. LIMITATIONS

Hemolytic and lipemic samples may give erroneous results. Do not measure hemolytic and lipemic samples.

13. REFERENCES

Ferrari A, Spaccapelo L, Pinetti D, Tacchi R, Bertolini A: Effective prophylactic treatments of migraine lower plasma glutamate levels. *Cephalalgia*. 2009 Apr; 29(4):423-9

Peres MF, Zukerman E, Senne Soares CA, Alonso EO, Santos BF, Faulhaber MH: Cerebrospinal fluid glutamate levels in chronic migraine. *Cephalalgia*. 2004 Sep; 24(9): 735-9

Castellanos M, et al: High plasma glutamate concentrations are associated with infarct growth in acute ischemic stroke. *Neurology*. 2008 Dec 2; 71(23): 1862-8

Castillo J, Martínez F, Corredera E, Aldrey JM, Noya M: Amino acid transmitters in patients with headache during the acute phase of cerebrovascular ischemic disease. *Stroke*. 1995 Nov; 26(11): 2035-9

Baad-Hansen L, Cairns BE, Ernberg M, Svensson P: Effect of systemic monosodium glutamate (MSG) on headache and pericranial muscle sensitivity. *Cephalalgia*. 2009 Apr 28

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- Test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for research use only.
- Reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- The guidelines for medical laboratories should be observed.
- 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 wrong use.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number