

Arbeitsanleitung / Manual

BCAA Kit

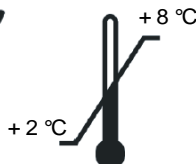
Zur Bestimmung von Leucin, Isoleucin und Valin in humanem EDTA-Plasma und Serum

For the determination of leucine, isoleucine and valine in human EDTA plasma and serum

Gültig ab / Valid from 31.10.2012



K 7016



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 contents	Seite / page
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. TESTPRINZIP	3
3 INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
7. PROBENVORBEREITUNG	5
8. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>PIPETTIERSCHEMA TESTDURCHFÜHRUNG</i>	<i>6</i>
9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	7
<i>ERWARTETE ERGEBNISSE</i>	<i>7</i>
10. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT</i>	<i>8</i>
<i>SENSITIVITÄT</i>	<i>9</i>
<i>WIEDERFINDUNG</i>	<i>10</i>
<i>LINEARITÄT</i>	<i>10</i>
<i>KREUZREAKTIVITÄT</i>	<i>11</i>
11. EINSCHRÄNKUNGEN	11
12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11

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

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 humanem EDTA-Plasma und Serum geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. 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.

3 INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K7016MTP	PLATE	Mikrotiterplatte	12 x 8 Vertiefungen
K7016ST	STD	Standards, lyophilisiert (0, 300, 1000, 3000 $\mu\text{mol/l}$)	4 x 1 Fläschchen
K7016KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen, lyophilisiert	2 x 1 Fläschchen
K7016AP	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	16 ml
K7016RP	REABUF	Reaktionspuffer, lyophilisiert	2 x 1 Fläschchen
K7016EL	ENZ	Leucin-Dehydrogenase, Konzentrat	2 x 1 Fläschchen

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 μl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte

- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- 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 < 0,055 µS/cm bei 25°C (≥18,2 MΩ cm).

5. 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 4x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- 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 und bis zu 3 mal wieder aufgetaut werden. Das Wiedereinfrieren sollte sofort nach Entnahme erfolgen.
- Der Inhalt eines Fläschchens **Reaktionspuffer (REABUF)** wird in **3,0 ml Reinstwasser** gelöst und gut gemischt. Gelöster Reaktionspuffer ist **6 Monate** bei **-20°C** haltbar. Durch die Aufteilung des REABUF in 2 Gefäße ist der Enzymtest in mindestens zwei Ansätze teilbar.
- 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. So verdünntes ENZ ist **6 Monate** bei **-20°C** haltbar. Durch die Aufteilung des ENZ in 2 Gefäße ist der Enzymtest in mindesten zwei Ansätze teilbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

7. PROBENVORBEREITUNG

- Als Probe eignet sich 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.
- Proben mit sichtbaren Mengen an Feststoff sollten zentrifugiert werden.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- EDTA-Plasma- und Serumproben werden unverdünnt verwendet.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettierolumina 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.

Pipettierschema Testdurchführung

1.	Positionen für Standards/Kontrollen/Proben (STD/ CTRL/ SAMPLE) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren.
2.	Die benötigten Streifen der Mikrotiterplatte (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt gelagert werden.
3.	2 x 25 µl Standard/ Kontrolle/ Probe (STD/ CTRL/ SAMPLE) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte (PLATE) pipettieren.
4.	Jeweils 100 µl Reinstwasser in alle verwendeten Vertiefungen pipettieren.
5.	50 µl Assaypuffer (ASYBUF) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	50 µl Reaktionspuffer (REABUF) in jede Vertiefung geben und die Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 340 nm messen (OD_{BLANK}).
7.	50 µl verdünnte Leucin-Dehydrogenase (ENZ) in alle Vertiefungen pipettieren. Streifen luftdicht abdecken.
8.	60 min bei Raumtemperatur inkubieren.
9.	Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer bei 340 nm messen (OD_{SAMPLE}).
10.	Die Auswertung der Rohdaten erfolgt wie in Kapitel 9 „Auswertung der Ergebnisse“ beschrieben.

9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

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:

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

Erwartete Ergebnisse

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n=146) wurde ein Mittelwert von 460 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt, bei einer Standardabweichung von 110,5 $\mu\text{mol/l}$.

Plasma-Mittelwert \pm 2 Standardabweichungen **460 \pm 221 $\mu\text{mol/l}$**

Normalbereich: **239 – 681 $\mu\text{mol/l}$**

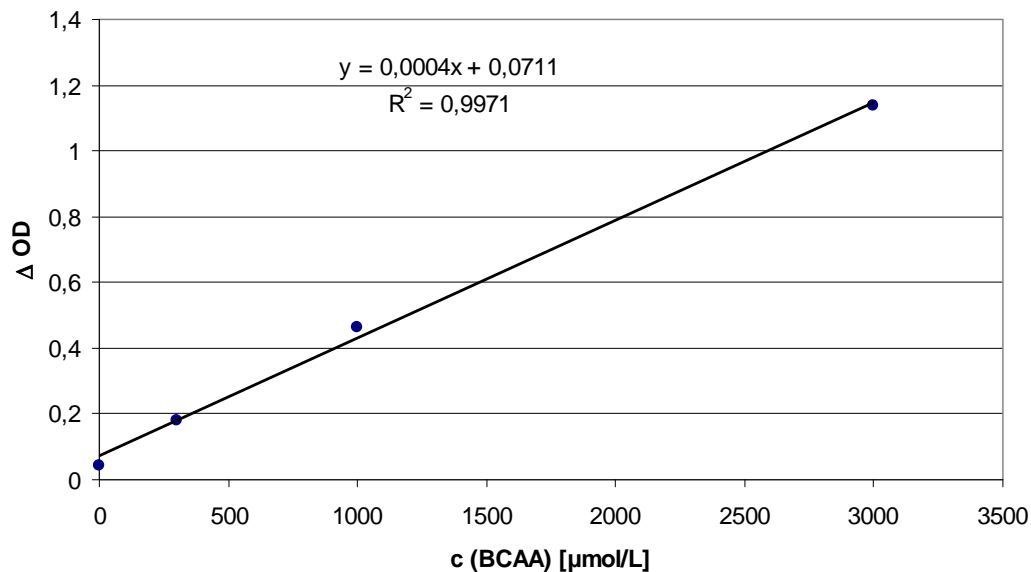
Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Normalbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

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

Die Konzentrationen der Kontrollen und Patientenproben können direkt aus der Kalibrierkurve in $\mu\text{mol/l}$ abgelesen werden. Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.

Musterkalibrierkurve



10. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Serum:

Inter-Assay (n=6)		
Probe	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	Variationskoeffizient (CV) [%]
1	465	3,7
2	193	8,9
3	425	6,6
4	171	8,0

Intra-Assay (n=6)		
Probe	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	Variationskoeffizient (CV) [%]
1	448	5,5
2	382	4,2

EDTA-Plasma:

Inter-Assay (n=6)		
Probe	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	Variationskoeffizient (CV) [%]
1	1627	3,1
2	828	3,6
3	1418	4,1
4	706	4,0

Intra-Assay (n=6)		
Probe	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	Variationskoeffizient (CV) [%]
1	453	9,3
2	1337	2,6

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde als $B_0 + 2 \text{ SD}$ festgelegt. Gemessen wurde 14 x der Standard Null.

Probe	B_0 [OD]	2 Standard- abweichungen (2 x SD)	Nachweis- grenze [$\mu\text{mol/l}$]
Standard Null	0,06	0,0023	5,8

Wiederfindung

Unterschiedliche Mengen an BCAA wurden zu jeweils zwei Serum- bzw. Plasmaproben gegeben (Spike) und anschließend im Enzymtest gemessen. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen betrug bei EDTA-Plasma 93,8 %, bei Serum 94,3 % (n=2).

EDTA-Plasma

Probe [µmol/l]	BCAA erwartet [µmol/l]	BCAA gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
577	1039	952	91,7
577	1789	1665	93,1
441	970	895	92,2
441	1720	1691	98,2

Serum

Probe [µmol/l]	BCAA erwartet [µmol/l]	BCAA gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
387	944	938	99,4
387	1694	1551	91,6
453	977	901	92,2
453	1727	1625	94,1

Linearität

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen von jeweils zwei Serum- bzw. Plasmaproben bestimmt. Die mittlere Linearität betrug für EDTA-Plasma 95,4 %, für Serum 88,1 % (n=2).

EDTA-Plasma

Probe [µmol/l]	Verdünnung	BCAA erwartet [µmol/l]	BCAA gemessen [µmol/l]	Wiederfindung [%]
577	1:2	289	266	92,1
1590	1:2	795	785	98,7

Serum

Probe [$\mu\text{mol/l}$]	Verdünnung	BCAA erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung [%]
387	1:2	194	167	87,6
453	1:2	227	201	88,6

Kreuzreaktivität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu L-Methionin gefunden.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

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

12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik 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 Pipettiervolumina 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



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis

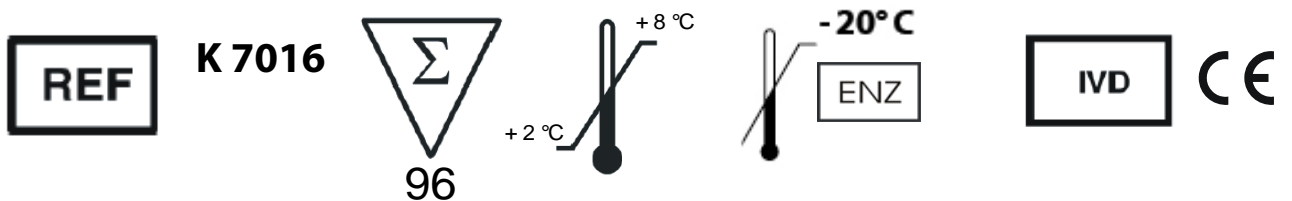


Chargenbezeichnung

BCAA Kit

For the determination of leucine, isoleucine and valine in human EDTA plasma and serum

Valid from 31.10.2012



1. INTENDED USE

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

2. 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.

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Content	Kit Components	Quantity
K7016MTP	PLATE	Microtiter plate	12 x 8 wells
K7016ST	STD	Standards, lyophilized (0, 300, 1000, 3000 $\mu\text{mol/l}$)	4 x 1 vial
K7016KO	CTRL 1 CTRL 2	Controls, lyophilized	2 x 1 vial
K7016AP	ASYBUF	Assay buffer, ready for use	16 ml
K7016RP	REABUF	Reaction buffer, lyophilized	2 x 1 vial
K7016EL	ENZ	Leucine dehydrogenase, concentrate	2 x 1 vial

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- 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 3000 x g
- Vortex-Mixer
- 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).

5. 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 4 times within the expiry date stated on the label.
- 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** and can be re-frozen up to 3 times. 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. The dissolved reaction buffer can be stored at **-20°C for 6 months**. By providing two REABUF vials the kit can be separated into at least two performances.
- 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, mix well. The diluted ENZ can be stored at **-20°C for 6 months**. By providing two ENZ vials the kit can be separated into at least two performances.
- All other test reagents are stable until date of expiry (see label) when stored at 2-8°C.

6. PRECAUTIONS

- It is for *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- EDTA plasma and serum is suited for this test system. Samples are stable for 48 h at 2-8°C. For longer storage samples should be frozen at -20°C.
- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- Samples are analyzed without any dilution.

8. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.
- 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.

Test procedure

1. Mark the positions of standards (STD)/ controls (CTRL)/ samples (SAMPLE) in duplicate on a protocol sheet.
2. Take as many microtiter plate strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered with foil.
3. Add 2 x 25 µl of standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE) into the respective wells of the microtiter plate (PLATE).
4. Add 100 µl of ultra pure water into each well.

5. Add 50 µl of assay buffer (ASYBUF) into each well.
6. Add 50 µl of reaction buffer (REABUF) into each well and determine absorption immediately with an ELISA reader at 340 nm (OD_{BLANK}) .
7. Add 50 µl of diluted leucine dehydrogenase (ENZ) into each well. Cover plate tightly.
8. Incubate for 60 minutes at room temperature .
9. Determine absorption at 340 nm (OD_{SAMPLE}) .
10. For analysis of obtained data see chapter 9 "evaluation of results".

9. 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, samples, and with correct sample treatment), standards, controls, and blood samples are equally diluted. Therefore, **no dilution factor is required for the calculation of results**.

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

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

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:

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

Expected results

Based on internal studies with plasma samples of evidently healthy persons (n=146) a mean value of 460 $\mu\text{mol/l}$ was calculated. The standard deviation was 110.5 $\mu\text{mol/l}$.

Plasma mean value $\pm 2 \times$ standard deviation: **460 \pm 221 $\mu\text{mol/l}$**

Normal range: **239 – 681 $\mu\text{mol/l}$**

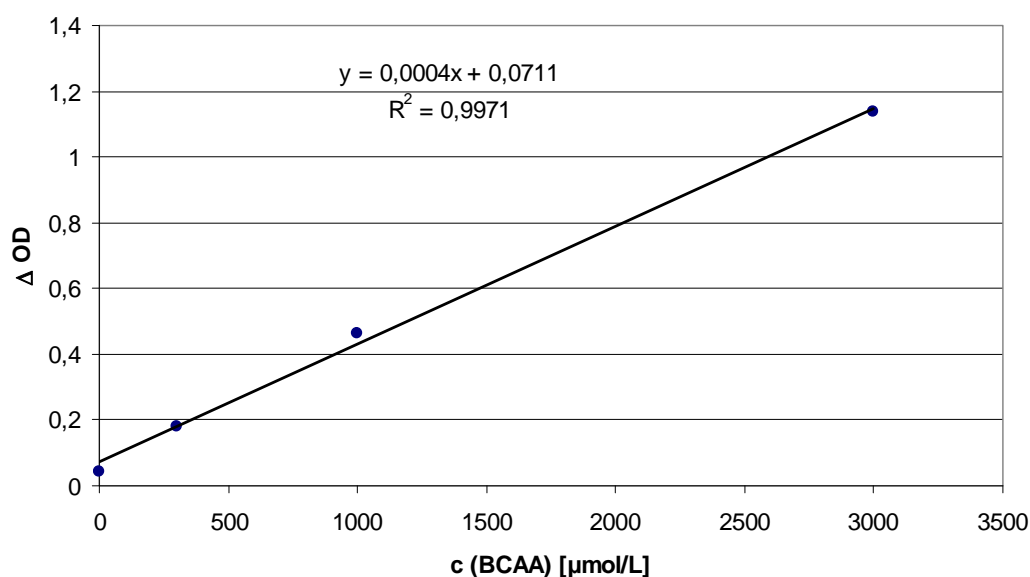
We recommend each laboratory to develop its own normal range. The values mentioned above are indicative only and can deviate from other published data.

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, do not use it for the calculation of your results.

Example of calibration curve



10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Serum

Inter-assay (n=6)		
Sample	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	coefficient of variation (CV) [%]
1	465	3.7
2	193	8.9
3	425	6.6
4	171	8.0

Intra-assay (n=6)		
Sample	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	coefficient of variation (CV) [%]
1	448	5.5
2	382	4.2

EDTA plasma

Inter-assay (n=6)		
Sample	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	coefficient of variation (CV) [%]
1	1627	3.1
2	828	3.6
3	1418	4.1
4	706	4.0

Intra-assay (n=6)		
Sample	BCAA [$\mu\text{mol/l}$]	coefficient of variation (CV) [%]
1	453	9.3
2	1337	2.6

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2SD$. The zero-standard was measured 14 times.

Sample	B_0 [OD]	2 x Standard deviation (SD)	Detection limit [$\mu\text{mol/l}$]
zero-standard	0.06	0.0023	5.8

Recovery

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

EDTA plasma

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

Serum

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

Linearity

Linearity of the assay was determined by the dilution of two serum and plasma samples. The mean linearity was 95,4 % for EDTA plasma and 88.1 % for serum (n=2).

EDTA plasma

sample [$\mu\text{mol/l}$]	dilution [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA expected [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
577	1:2	289	266	92.1
1590	1:2	795	785	98.7

Serum

sample [$\mu\text{mol/l}$]	dilution [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA expected [$\mu\text{mol/l}$]	BCAA measured [$\mu\text{mol/l}$]	recovery [%]
387	1:2	194	167	87.6
453	1:2	227	201	88.6

Cross Reactivity

No cross reactivity with L-Methionin was found.








11. LIMITATIONS

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

12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the test package are for *in vitro* diagnostic 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.
- 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
	In Vitro Diagnostic Medical Device		Contains sufficient for <n> tests
	Manufacturer		Use by
	Lot number		