



## Gebrauchsanweisung

# Serotonin ELISA

Enzymimmunoassay für die  
Quantitative Bestimmung von  
**Serotonin**

**in humanem Serum und Urin**

Teil I ab S. 4



**und für Forschungszwecke in EDTA-Plasma**

Teil II ab S. 16

**RUO**


Art. Nr. EA602/96



12 x 8



2 – 8 °C

**REF** SER00  Wesamin GmbH & Co. KG • Graff 1 • 24568 Oersdorf • Germany












Distributor: DLD Diagnostika GmbH • Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Germany

Tel. +49 40 5558710 • Fax +49 40 55587111 • [contact@dld-diagnostika.de](mailto:contact@dld-diagnostika.de) • [www.dld-diagnostika.de](http://www.dld-diagnostika.de)

## Inhaltsverzeichnis

I	Gebrauchsanweisung für die quantitative Bestimmung von Serotonin in humanen Serum und Urin für die In-Vitro-Diagnostik .....	4
1	Einleitung und Testprinzip .....	4
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen .....	5
3	Lagerung und Haltbarkeit .....	6
4	Inhalt des Kits .....	6
5	Probengewinnung und -lagerung .....	8
6	Vorbereitung der Reagenzien und Proben .....	9
7	Testdurchführung ELISA .....	11
8	Auswertung .....	12
9	Testcharakteristika .....	13
10	Literatur .....	15
II	Gebrauchsanweisung für die quantitative Bestimmung von Serotonin in humanen EDTA-Plasma nur für Forschungszwecke .....	16
1	Testprinzip .....	16
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen .....	17
3	Lagerung und Haltbarkeit .....	18
4	Inhalt des Kits .....	18
5	Probengewinnung und -lagerung .....	20
6	Vorbereitung der Reagenzien und Proben .....	20
7	Testdurchführung ELISA .....	23
8	Auswertung .....	24
9	Testcharakteristika .....	25
	Pipettierschema .....	28

## Verwendete Symbole

 IVD	In-Vitro-Diagnostikum		EG Konformitätserklärung
 CONT	Inhalt		Verwendbar bis
 LOT	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
 REF	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten
 RUO	Für Forschungszwecke		

## Änderungen

Version \_9: Trennung der Gebrauchsanweisung nach „für die In-Vitro-Diagnostik“ (IVD; Serum und Urin) und „nur für Forschungszwecke“ (RUO; EDTA-Plasma).

Version \_8: Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen um Hinweis bzgl. Natrium Azid ergänzt (gültig ab SER124)

Version \_7: Es wurden umfangreiche Änderungen vorgenommen, die in grau hervorgehoben sind (gültig ab SER123).

Version \_6: Die Arbeitsanleitung wurde neu formatiert. Die Hersteller- und Distributorangaben wurden geändert. Das Pipettierschema wurde überarbeitet und um die Komponentenbezeichnung laut Etikett ergänzt, um die Zuordnung zu erleichtern. Es wurden keine Änderungen an den Komponenten oder an der Durchführung vorgenommen.

## **I Gebrauchsanweisung für die quantitative Bestimmung von Serotonin in humanen Serum und Urin für die In-Vitro-Diagnostik**

### **1 Einleitung und Testprinzip**

Serotonin (5-Hydroxytryptamin) gehört in die Gruppe der biogenen Amine und ist ein Intermediärprodukt des Tryptophanstoffwechsels. Es ist ein gut dokumentierter Neurotransmitter des zentralen Nervensystems und ist in hohen Konzentrationen in den chromaffinen Zellen der Darmschleimhaut, in den Thrombozyten und den serotonergen Neuronen des Gehirns nachweisbar.

Zentral-serotonerge Neuronen beeinflussen physiologische Funktionen wie z. B. den Schlaf sowie die hormonelle und kardio-vaskuläre Regulation. Erhöhte Serumspiegel werden bei malignem Karzinoid, bei endogener Depression und Schizophrenie beobachtet. Serotonin ist ein spezifischer Tumormarker für das maligne Karzinoid.

Der Serotonin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem Serotonin in humanen Serum- und Urinproben. Nach der Probenvorbereitung in der Preparation-Platte erfolgt die Derivatisierung in der ELISA-Platte. Dabei wird Serotonin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acylserotonin umgewandelt.

Der Serotonin-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. An die Festphase gebundenes und freies, in Lösung befindliches Antigen konkurrieren um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex in einem Waschschrift entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines Peroxidase-Konjugats nachgewiesen und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Die TMB/POD-Reaktion wird gestoppt und bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.

## 2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur In-Vitro-Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testkits sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Eine Gefahrstoffkennzeichnung der Kitkomponenten ist entsprechend der CLP-Verordnung Nr. 1272/2008 nicht erforderlich. Ausführliche Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Eine Komponente enthält eine geringe Menge Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie reichlich mit Wasser nachspülen.
- Zerbrochenes Glas kann zu Verletzungen führen. Vorsicht bei Glasgefäßen.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

### 3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur geliefert und ist anschließend bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Fläschchenetikett angegeben. Zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien siehe 6.1.

Alle Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

### 4 Inhalt des Kits

**MT-Streifen** STRIPS 12 Stück  
 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen  
 Einzeln abbrechbar, beschichtet mit  
 N-Acylserotonin

**Standards 1 – 6** CAL 1 - 6 6 Fläschchen  
 Je 4 ml, gebrauchsfertig, Konzentrationen:

Standards	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	30	75	200	500	1500
nmol / l	0	170	426	1135	2838	8513

**Kontrolle 1 & 2** CON 1 & 2 2 Fläschchen  
 Je 4 ml, gebrauchsfertig  
 Bereich: siehe Q.C.-Zertifikat

**Acylierungspuffer** ACYL-BUFF 1 Fläschchen  
 35 ml, gebrauchsfertig, blau eingefärbt

**Acylierungs-Reagenz** ACYL-REAG 4 Fläschchen  
 lyophilisiert, mit 3 ml Solvent lösen

**Antiserum** AS 1 Fläschchen  
 14 ml, gebrauchsfertig, gelb eingefärbt  
 Kaninchen-anti-N-Acylserotonin

<b>Enzymkonjugat</b> 14 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ	1 Fläschchen
<b>Waschpuffer</b> 20 ml, Konzentrat (50x)	WASH	1 Fläschchen
<b>Substrat</b> 14 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig	SUB	1 Fläschchen
<b>Stopplösung</b> 14 ml, gebrauchsfertig Enthält 0,3M Schwefelsäure	STOP	1 Fläschchen
<b>Preparation-Platte</b> Für die Probenvorbereitung	PRE-PLATE	1 Stück
<b>Ausgleichsreagenz</b> Lyophilisiert, mit 35 ml Acylierungspuffer lösen	EQUA-REAG	1 Fläschchen
<b>Solvent</b> 14 ml gebrauchsfertig, gelb gefärbt	SOLVENT	1 Fläschchen

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 10, 20, 50, 100 und 200 µl und Multipipette
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Horizontalschüttler
- Vortex-Mischer und Rollmischer
- Zentrifuge
- Destilliertes Wasser
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)

## **5 Probengewinnung und -lagerung**

Serotonin ist besonders lichtempfindlich und die Proben sollten nach der Abnahme kühl und dunkel lagern.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Die Patienten sollten vor der Probenentnahme bzw. vor und während der Urinsammlung auf den Serotoninspiegel beeinflussende Lebensmittel und Medikamente verzichten, dazu gehören z.B. die Lebensmittel Avocados, Auberginen, Ananas, Bananen, Zwetschgen, Mirabellen, Johannesbeeren, Stachelbeeren, Kiwi, Melone, Tomaten, Wallnüsse, Kaffee und Medikamente wie z.B. Methocarbamol, Mephesisin, Paractamol, Salicylate, MAO-Inhibitoren, Nicotin.

### **5.1 Serum**

Für den Test kann humanes Serum eingesetzt werden.

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten im Assay nicht eingesetzt werden.

Die Proben können bis zu 6 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert werden.

### **5.2 Urin**

Es kann sowohl Spontanurin als auch Sammelurin verwendet werden.

Sammelurin: Der gesamte Urin, der während einer Periode von 24 Stunden ausgeschieden wird, wird in einem Behälter, der 10 – 15 ml 6 N Salzsäure (Achtung: Gefahrenhinweise beachten) als Konservierungsmittel enthält, gesammelt. Direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden. Die Lagerung muss während der Sammlung im Dunkeln erfolgen. Das Gesamtvolumen wird bestimmt und ein Aliquot für die Messung entnommen. Bei Verdacht auf eine Nierenfunktionsstörung sollte auch eine Kreatininbestimmung durchgeführt werden. Urinproben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert werden. Nicht angesäuerte Sammelurine nicht verwenden.

**Urin vor Gebrauch mischen und zentrifugieren.**



## 6 Vorbereitung der Reagenzien und Proben

### 6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

#### 6.1.1 Waschpuffer

Inhalt (20ml) der Flasche **WASH** mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1.000 ml verdünnen, kurz mischen. Der fertige Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

Wird der Kit in mehreren Ansätzen verwendet, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

#### 6.1.2 Ausgleichsreagenz

Zur Rekonstitution des lyophilisierten Ausgleichsreagenzes den Inhalt des Acylierungspuffers **ACYL-BUFF** vollständig in das Fläschchen des Ausgleichsreagenzes **EQUA-REAG** überführen. Kurz mischen und mindestens 20 min auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler bis zum vollständigen Lösen mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden. Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

#### 6.1.3 Acylierungs-Reagenz

Benötigte Fläschchen Acylierungs-Reagenz **ACYL-REAG** dem Folienbeutel entnehmen, die übrigen Fläschchen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen. Zur Rekonstitution des lyophilisierten Acylierungs-Reagenzes den Inhalt eines Fläschchens mit 3 ml Solvent **SOLVENT** lösen und mindestens 5 Minuten auf dem Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann ca. 3 Stunden stabil. Im Kit sind 4 Fläschchen Acylierungs-Reagenz enthalten, sodass der ELISA mehrmals teilbar ist. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt von zwei Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das rekonstituierte Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

## 6.2 Probenvorbereitung

Es wird empfohlen Doppelbestimmungen durchzuführen. Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Preparations-Platte **PRE-PLATE** markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

1. **10 µl Standard 1 – 6** **CAL 1 – 6**  
**10 µl Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2** und  
**10 µl Serum** und/oder  
**10 µl Urin** in die jeweiligen Vertiefungen der Preparations-Platte **PRE-PLATE** pipettieren.
2. **200 µl Ausgleichsreagenz** **EQUA-REAG** in jede Vertiefung pipettieren.
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

Je 20 µl der so vorbereiteten Standards, Kontrollen und Proben werden in den Serotonin-ELISA eingesetzt.

## 7 Testdurchführung ELISA

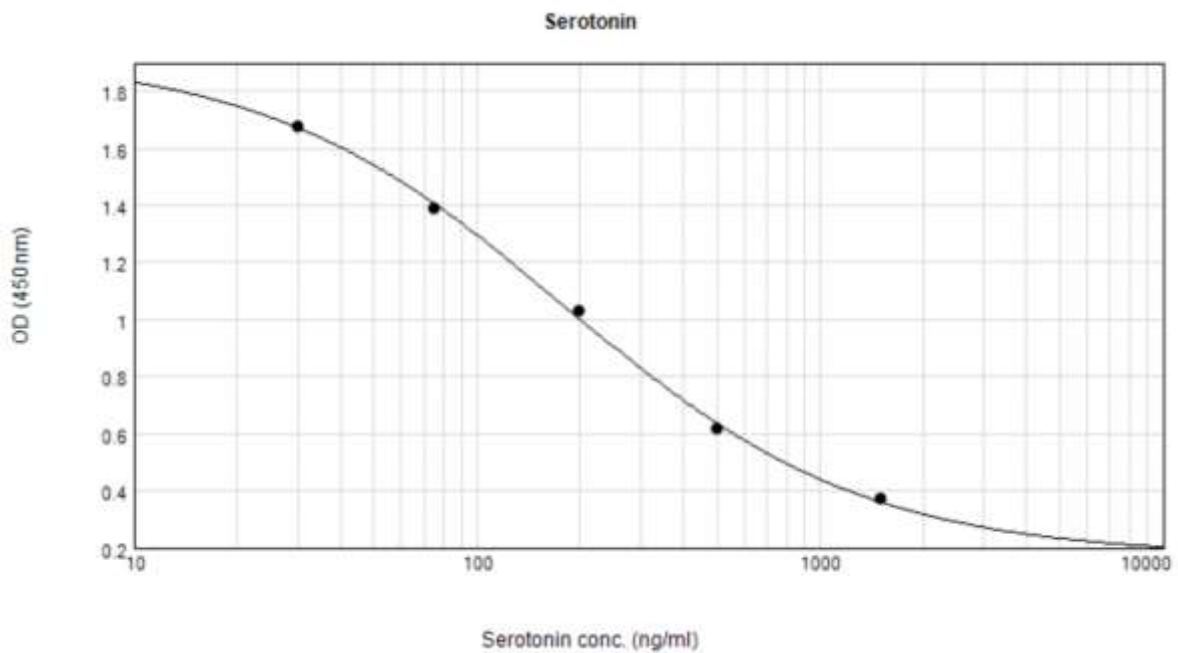
1. Jeweils **20 µl der vorverdünnten Standards, Kontrollen und Proben** aus der Preparations-Platte in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS** pipettieren. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen.
2. **50 µl Acylierungsreagenz** **ACYL-REAG** in jede Vertiefung pipettieren und **sofort** mit Punkt 3. fortfahren.
3. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. **100 µl Antiserum** **AS** in jede Vertiefung pipettieren. Bitte Multipette oder Ähnliches (keine Einkanal- oder Mehrkanalpipetten) verwenden.
5. Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
6. Vertiefungen entleeren, jede mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer** **WASH** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen. Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
7. **100 µl Enzymkonjugat** **CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
8. Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
9. Waschen: Wie unter Punkt 6. beschrieben.
10. **100 µl Substrat** **SUB** in jede Vertiefung pipettieren.
11. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln, dann für  $15 \pm 5$  Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer großen Box abgedeckt, ohne schütteln, inkubieren.
12. **100 µl Stopplösung** **STOP** in jede Vertiefung pipettieren.  
10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
13. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

## 8 Auswertung

Die OD (optische Dichten)-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Bei der Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen. (Alternativ: Cubic-Spline oder logit-Log).

Die Konzentrationen der Kontrollen, Urin- und Serumproben können dann direkt aus der Eichkurve in ng/ml abgelesen werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



Standard	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	30	75	200	500	1500
nmol/l	0	170	426	1135	2838	8513

Umrechnung: Serotonin: 1 ng/ml = 5,675 nmol/l

Qualitätskontrolle: Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des Qualitätskontrollzertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.

## 9 Testcharakteristika

### 9.1 Referenzbereiche

Die angegebenen Referenzbereiche gelten lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

Matrix	Referenzbereich
Serum	40 - 200 ng/ml
Urin	< 250 µg/Tag

### 9.2 Analytische Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Serum, Urin	11,8	OD <sub>Cal1</sub> - 2xSD

### 9.3 Analytische Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Serotonin	100
Tryptamin	1,9
5-Methoxytryptamin	0,37
Melatonin	< 0,019
5-Hydroxy-L- Tryptohan	< 0,019
5-HIAA	< 0,0019
L-Tryptohan	< 0,00174

### 9.4 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Serum	112 - 720	104	98 - 109
Urin	48 - 681	105	93 - 116

**9.5 Linearität (Wiederfindung nach Verdünnung mit dest. Wasser)**

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verdünnung	Mittelwert	Bereich (%)
Serum	46 - 795	1 : 15	88	85 - 96
Urin	21 - 329	1 : 15	94	84 - 99

**9.6 Reproduzierbarkeit**

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk (%)	Bereich (ng/ml)	Inter-Assay-Vk (%)
Serum	121 – 649	7,4 - 6,6 %	110 – 591	7,7 – 6,3
Urin	115 – 429	7,9 – 4,1 %	139 – 399	8,7 – 6,1

**9.7 Methodenvergleich**

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Serum	LC-MS	$Y = 1,04 \times \text{LC-MS} + 2$ ; $R = 0,981$ ; $N = 30$
Urin	HPLC	$Y = 0,91 \times \text{HPLC} + 7$ ; $R = 0,972$ ; $N = 28$

**9.8 Kalibrierung**

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Methodenvergleichen (9.7) festgestellt.

**9.9 Grenzen der Methode**

Das Ergebnis des Serotonin Elisas ist im Zusammenhang mit weiteren diagnostischen Verfahren und der Anamnese und der daraus resultierenden Fragestellung zu sehen. Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit destilliertem Wasser verdünnt und erneut bestimmt werden. Die Werte von verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Serotonin im EDTA-Plasma kann nur für Forschungszwecke bestimmt werden.

**9.10 Interferenzen**

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Nicht angesäuerte Sammelurine nicht verwenden.

## 10 Literatur

- Kema, P.; de Vries, E.; Muskiet, F. (2000):  
**Clinical chemistry of serotonin and metabolites**  
Journal of Chromatography B, 747 33–48
- Lechin, F.; van der Dijs, B.; Lechin, A. (2005):  
**Circulating Serotonin, Catecholamines, and Central Nervous System Circuitry Related to Some Cardiorespiratory, Vascular, and Hematological Disorders**  
The Journal of Applied Research Vol. 5, No. 4
- Spaeth, M. (2006):  
**Fibromyalgia Syndrome: The Role of Neurochemicals**  
Primary Psychiatry. 13(9):72-75
- Spivak, B.; Vered, Y.; Graff, E.; et al. (1999):  
**Low Platelet-Poor Plasma Concentrations of Serotonin in Patients with Combat-Related Posttraumatic Stress Disorder**  
BIOL PSYCHIATRY. 45:840–845
- Ernberg, M.; Lundberg, T.; Kopp, S. (2000):  
Pain and allodynia/hyperalgesia induced by intramuscular injection of serotonin in patients with fibromyalgia and healthy individuals  
Pain 85 31±39
- Alvarez, J.; Gluck, N.; Fallet, A.; et al. (1999):  
**Plasma serotonin level after 1 day of fluoxetine treatment: a biological predictor for antidepressant response?**  
Psychopharmacology 143 : 97.101
- Mück-Seler, D.; Pivac, N.; Jakovljevic, M.; et al. (1999):  
**Platelet Serotonin, Plasma Cortisol, and Dexamethasone Suppression Test in Schizophrenic Patients**  
BIOL PSYCHIATRY 45:1433–1439
- Vikenes, K.; Farstad, M.; Nordrehaug, J. (1999):  
**Serotonin Is Associated with Coronary Artery Disease and Cardiac Events**  
*Circulation* August 3, 1999; 483-489
- Dayan, P.; Huys, Q.. (2008):  
**Serotonin, Inhibition, and Negative Mood**  
PLoS Computational Biology February 2008 | Volume 4 | Issue 2 | e4
- Leboyer, M.; Philippe, A.; Bouvard, M.; et al. (1999):  
**Whole Blood Serotonin and Plasma Beta-Endorphin in Autistic Probands and Their First-Degree Relatives**  
BIOL PSYCHIATRY 1999;45:158–163

## **II Gebrauchsanweisung für die quantitative Bestimmung von Serotonin in humanen EDTA-Plasma nur für Forschungszwecke**

### **1 Testprinzip**

Der Serotonin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem Serotonin in humanen EDTA-Plasmaproben. Nach der Probenvorbereitung in der Preparation-Platte erfolgt die Derivatisierung in der ELISA-Platte. Dabei wird Serotonin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acylserotonin umgewandelt.

Der Serotonin-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. An die Festphase gebundenes und freies, in Lösung befindliches Antigen konkurrieren um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex in einem Waschschrift entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines Peroxidase-Konjugats nachgewiesen und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Die TMB/POD-Reaktion wird gestoppt und bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.



## 2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testkits sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Proben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Eine Gefahrstoffkennzeichnung der Kitkomponenten ist entsprechend der CLP-Verordnung Nr. 1272/2008 nicht erforderlich. Ausführliche Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Eine Komponente enthält eine geringe Menge Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie reichlich mit Wasser nachspülen
- Zerbrochenes Glas kann zu Verletzungen führen. Vorsicht bei Glasgefäßen.

### 3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur geliefert und ist anschließend bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Fläschchenetikett angegeben. Zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien siehe 6.1.

Alle Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

### 4 Inhalt des Kits

**MT-Streifen** STRIPS 12 Stück  
 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen  
 Einzeln abbrechbar, beschichtet mit  
 N-Acylserotonin

**Standards 1 – 6** CAL 1 - 6 6 Fläschchen  
 Je 4 ml, gebrauchsfertig, Konzentrationen:

Standards	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	30	75	200	500	1500
nmol / l	0	170	426	1135	2838	8513

**Kontrolle 1 & 2** CON 1 & 2 2 Fläschchen  
 Je 4 ml, gebrauchsfertig  
 Bereich: siehe Q.C.-Zertifikat

**Acylierungspuffer** ACYL-BUFF 1 Fläschchen  
 35 ml, gebrauchsfertig, blau eingefärbt

**Acylierungs-Reagenz** ACYL-REAG 4 Fläschchen  
 lyophilisiert, mit 3 ml Solvent lösen

**Antiserum** AS 1 Fläschchen  
 14 ml, gebrauchsfertig, gelb eingefärbt  
 Kaninchen-anti-N-Acylserotonin

<b>Enzymkonjugat</b> 14 ml, gebrauchsfertig Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ	1 Fläschchen
<b>Waschpuffer</b> 20 ml, Konzentrat (50x)	WASH	1 Fläschchen
<b>Substrat</b> 14 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig	SUB	1 Fläschchen
<b>Stopplösung</b> 14 ml, gebrauchsfertig Enthält 0,3M Schwefelsäure	STOP	1 Fläschchen
<b>Preparation-Platte</b> Für die Probenvorbereitung	PRE-PLATE	1 Stück
<b>Ausgleichsreagenz</b> Lyophilisiert, mit 35 ml Acylierungspuffer lösen	EQUA-REAG	1 Fläschchen
<b>Solvent</b> 14 ml gebrauchsfertig, gelb gefärbt	SOLVENT	1 Fläschchen

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 10, 20, 50, 100 und 200 µl und Multipipette
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Horizontalschüttler
- Vortex-Mischer und Rollmischer
- Zentrifuge
- Destilliertes Wasser
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 nm)

## **5 Probengewinnung und -lagerung**

Serotonin ist besonders lichtempfindlich und die Proben sollten nach der Abnahme kühl und dunkel lagern.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Die Spender sollten vor der Probenentnahme auf den Serotoninspiegel beeinflussende Lebensmittel und Medikamente verzichten, dazu gehören z.B. die Lebensmittel Avocados, Auberginen, Ananas, Bananen, Zwetschgen, Mirabellen, Johannesbeeren, Stachelbeeren, Kiwi, Melone, Tomaten, Wallnüsse, Kaffee und Medikamente wie z.B. Methocarbamol, Mephenesin, Paracetamol, Salicylate, MAO-Inhibitoren, Nicotin.

### **5.1 EDTA-Plasma für Forschungszwecke**

Bei der Verwendung von EDTA-Plasma ist es besonders wichtig, dass die Probe frei von Thrombozyten ist. Ansonsten muss die Serotonin-Konzentration auf die Anzahl der Thrombozyten in der Probe bezogen werden. Da die Herstellung plättchenfreien Plasmas spezielle Vorsichtsmaßnahmen erfordert, empfehlen wir Serum statt Plasma zu verwenden.

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten im Assay nicht eingesetzt werden.

Die Proben können bis zu 6 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert werden.

## **6 Vorbereitung der Reagenzien und Proben**

### **6.1 Vorbereitung der Reagenzien**

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

#### **6.1.1 Waschpuffer**

Inhalt (20ml) der Flasche **WASH** mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1.000 ml verdünnen, kurz mischen. Der fertige Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

Wird der Kit in mehreren Ansätzen verwendet, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

### 6.1.2 Ausgleichsreagenz

Zur Rekonstitution des lyophilisierten Ausgleichsreagenzes den Inhalt des Acylierungspuffers **ACYL-BUFF** vollständig in das Fläschchen des Ausgleichsreagenzes **EQUA-REAG** überführen. Kurz mischen und mindestens 20 min auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler bis zum vollständigen Lösen mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden. Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

### 6.1.3 Acylierungs-Reagenz

Benötigte Fläschchen Acylierungs-Reagenz **ACYL-REAG** dem Folienbeutel entnehmen, die übrigen Fläschchen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen. Zur Rekonstitution des lyophilisierten Acylierungs-Reagenzes den Inhalt eines Fläschchens mit 3 ml Solvent **SOLVENT** lösen und mindestens 5 Minuten auf dem Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann ca. 3 Stunden stabil. Im Kit sind 4 Fläschchen Acylierungs-Reagenz enthalten, sodass der ELISA mehrmals teilbar ist. Wenn der Kit in einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt von zwei Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das rekonstituierte Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

## 6.2 Probenvorbereitung

Es wird empfohlen Doppelbestimmungen durchzuführen. Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Preparations-Platte **PRE-PLATE** markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

Die Plasmaproben können im gleichen Ansatz wie die Serum- und Urinproben abgearbeitet werden (Probenvolumen beachten).

1. **10 µl Standard 1 – 6** **CAL 1 – 6**  
**10 µl Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2** und  
**20 µl EDTA-Plasma** in die jeweiligen Vertiefungen der Preparations-Platte **PRE-PLATE** pipettieren.
2. **200 µl Ausgleichsreagenz** **EQUA-REAG** in jede Vertiefung pipettieren.
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.

Je 20 µl der so vorbereiteten Standards, Kontrollen und Proben werden in den Serotonin-ELISA eingesetzt.

## 7 Testdurchführung ELISA

1. Jeweils **20 µl der vorverdünnten Standards, Kontrollen und Proben** aus der Preparations-Platte in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS** pipettieren. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen im Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel belassen und sorgfältig verschließen.
2. **50 µl Acylierungsreagenz ACYL-REAG** in jede Vertiefung pipettieren und **sofort** mit Punkt 3. fortfahren.
3. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. **100 µl Antiserum AS** in jede Vertiefung pipettieren. Bitte Multipette oder Ähnliches (keine Einkanal- oder Mehrkanalpipetten) verwenden.
5. Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
6. Vertiefungen entleeren, jede mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer WASH** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen. Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
7. **100 µl Enzymkonjugat CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
8. Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
9. Waschen: Wie unter Punkt 6. beschrieben.
10. **100 µl Substrat SUB** in jede Vertiefung pipettieren.
11. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln, dann für 15 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf dem Arbeitstisch mit einer großen Box abgedeckt, ohne schütteln, inkubieren.
12. **100 µl Stopplösung STOP** in jede Vertiefung pipettieren.  
10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
13. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

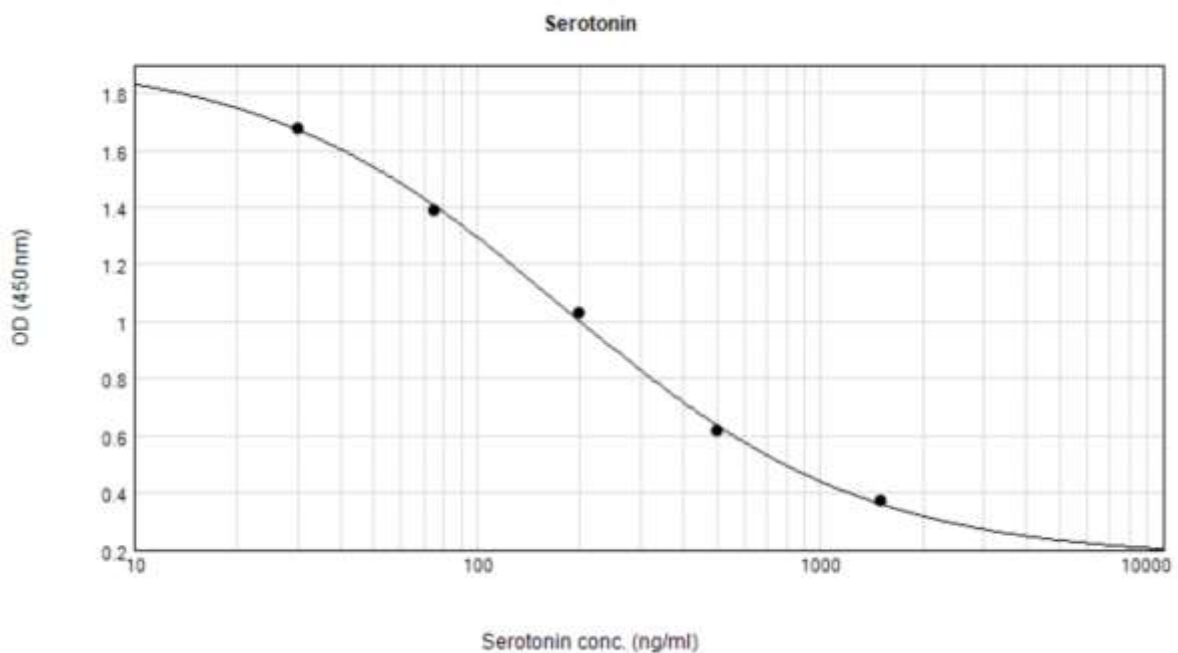
## 8 Auswertung

Die OD (optische Dichten)-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Bei der Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen. (Alternativ: Cubic-Spline oder logit-Log).

Die Konzentrationen der Kontrollen können dann direkt aus der Eichkurve in ng/ml abgelesen werden.

Die abgelesenen Werte für die Plasma-Proben müssen durch den Faktor 2 geteilt werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



Standard	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	30	75	200	500	1500
nmol/l	0	170	426	1135	2838	8513

Umrechnung: Serotonin: 1 ng/ml = 5,675 nmol/l

Qualitätskontrolle: Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des Qualitätskontrollzertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.



## 9 Testcharakteristika

### 9.1.1 Analytische Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Plasma	5,9	OD <sub>Cal1</sub> - 2xSD

### 9.2 Analytische Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Serotonin	100
Tryptamin	1,9
5-Methoxytryptamin	0,37
Melatonin	< 0,019
5-Hydroxy-L- Tryptohan	< 0,019
5-HIAA	< 0,0019
L-Tryptohan	< 0,00174

### 9.3 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Plasma	87 - 375	102	97 - 105

### 9.4 Linearität (Wiederfindung nach Verdünnung mit dest. Wasser)

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verdünnung	Mittelwert	Bereich (%)
Plasma	29 - 333	1 : 10	88	84 - 93

### 9.5 Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk (%)	Bereich (ng/ml)	Inter-Assay-Vk (%)
Plasma	287	8,3 %	79 - 259	8,6 – 7,4

### 9.6 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz.

### **9.7 Grenzen der Methode**

Ergebnisse für EDTA-Plasmen sind nur für Forschungszwecke geeignet. Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit destilliertem Wasser verdünnt und erneut bestimmt werden. Die Werte von verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

### **9.8 Interferenzen**

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.



**Pipettierschema****Probenvorbereitung**

		Standards	Kontrollen	Serum, Urin	EDTA-Plasma (Forschungszwecke)
PRE-PLATE:					
CAL 1 – 6	µl	10			
CON 1 & 2	µl		10		
Probe	µl			10	20
EQUA-REAG	µl	200	200	200	200

Platte für 5 Minuten schütteln  
20 µl im ELISA einsetzen

**ELISA**

		Verdünnte Standards	Verdünnte Kontrollen	Verdünntes Serum, Urin	Verdünntes Plasma
STRIPS:					
Übertragung von PRE-PLATE in STRIPS	µl	20	20	20	20
ACYL-REAG	µl	50	50	50	50

**Sofort** 20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

AS	µl	100	100	100	100
----	----	-----	-----	-----	-----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln  
4 x Waschen mit 300 µl **WASH** pro Vertiefung

CONJ	µl	100	100	100	100
------	----	-----	-----	-----	-----

15 Minuten bei Raumtemperatur schütteln  
4 x Waschen mit 300 µl **WASH** pro Vertiefung

SUB	µl	100	100	100	100
-----	----	-----	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln  
15 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt (Box), ohne schütteln

STOP	µl	100	100	100	100
------	----	-----	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln  
Messung der Extinktion bei 450 nm (Ref. 570 – 650 nm)