DIAGNOSTIKA GMBH

Arbeitsanleitung

Serotonin ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von Serotonin
in Serum, Plasma und Urin

CE

IVD

REF EA602/96

Σ 12 x 8

+2 +8 °C 2 – 8 °C

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Tel 040-555 87 10 • Fax 040-555 87 111
Internet: http://www.dld-diagnostika.de • E-Mail: contact@dld-diagnostika.de

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Testprinzip	Seite	5
2.	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Seite	6
3.	Lagerung und Haltbarkeit	Seite	6
4.	Inhalt des Testbestecks	Seite	6
5.	Probengewinnung	Seite	8
6.	Vorbereitung der Reagenzien und Proben	Seite	9
7.	Testdurchführung ELISA	Seite	10
8.	Auswertung und Beurteilung	Seite	11
9.	Testcharakteristika	Seite	12
10.	Literatur	Seite	14
	Pipettierschema	Seite	16

Verwendete Symbole

I V D In-Vitro-Diagnostikum

CONT Inhalt

LOT Chargenbezeichnung

Hersteller

REF Bestellnummer

CE markiert

Verwendbar bis

Temperaturbegrenzung

Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole

Gefahr

Achtung

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 (5-Hydroxytryptamin) in humanen Serum-, Plasma- und Urinproben. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. 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 Waschschritt 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

- Dieser Kit ist lediglich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.
- Die angegebenen Verfallsdaten sind unbedingt zu beachten.
- Die Reagenzien bis zur Verwendung bei 2 - 8 °C lagern.
- Während der Testdurchführung Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, 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.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit ist bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar. Zur Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien siehe Vorbereitung der Reagenzien.

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

4. Inhalt des Testbesteckes

4.1 **MT-Streifen** **STRIPS** 12 Stück
Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen,
einzeln abbrechbar, beschichtet mit Serotonin

4.2 **Standards 1 - 6** **CAL 1-6** 6 Fläschchen
Je 4 ml, gebrauchsfertig

Konzentrationen:

Standard	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	15	50	150	500	2.500

4.3 **Kontrolle 1 & 2** **CON 1 & 2** 2 Fläschchen
Je 4 ml, gebrauchsfertig
Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat im Kit

4.4 **Acylierungspuffer** **ACYL-BUFF** 1 Fläschchen
3 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt

Achtung

4.5 **Acylierungsreagenz** **ACYL-REAG** 1 Fläschchen
2,5 ml, gebrauchsfertig, enthält DMSO und DMF;
(Bitte beachten: Lösungsmittel reagieren mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschälchen. Sie reagieren nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen!)

Gefahr, Achtung

4.6 **Antiserum** **AS** 1 Fläschchen
11 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt
Kaninchen-anti-N-Acylserotonin

4.7 **Enzymkonjugat** **CONJ** 1 Fläschchen
12 ml, gebrauchsfertig
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase

4.8 **Waschpuffer** **WASH** 1 Fläschchen
20 ml, Konzentrat (50x)
Inhalt mit dest. Wasser auf 1 Liter auffüllen.

4.9 **Substrat** **SUB** 1 Fläschchen
12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig

4.10 **Stopplösung** **STOP** 1 Fläschchen
12 ml, gebrauchsfertig
Enthält 0,3 M Schwefelsäure

4.11 **Reaktionsplatte** **ACYL-PLATE** 1 Stück
für die Acylierung

4.12 **Ausgleichsreagenz** **EQUA-REAG** 1 Fläschchen
lyophilisiert, mit 20,5 ml dest. Wasser lösen

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 10, 25, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Horizontalschüttler
- Photometer für die Auswertung von Mikrotiterplatten (450 nm)

5. Probengewinnung

5.1. Serum und Plasma

Für den Test kann sowohl Serum als auch EDTA-Plasma eingesetzt werden.

Wenn Plasma verwendet wird 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 und insbesondere lipämische 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.

Wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen sollte vermieden 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 als Konservierungsmittel enthält, gesammelt. Direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden. 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.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Waschpuffer **WASH**

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 1.000 ml auffüllen. Der fertige Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 - 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar. Für eine Lagerung bis zum Verfallsdatum muss der verdünnte Waschpuffer bei -20 °C eingefroren werden.

6.2 Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG**

Inhalt des Fläschchens in 20,5 ml destilliertem Wasser lösen, kurz mischen und 30 min auf den Rollmischer legen. Vorsichtig mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden. Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so für mind. 1 Jahr verwendbar.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.3. Probenvorbereitung (Acylierung)

Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Reaktionsplatte markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

1. Je 20 µl Standard 1 - 6, je 20 µl Kontrolle 1 & 2, je 20 µl Serum , 20 µl Urin oder 40 µl Plasma in die jeweiligen Vertiefungen der im Kit enthaltenen Reaktionsplatte pipettieren.
2. Je 20 µl Acylierungspuffer in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Je 200 µl Ausgleichsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren.
   Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
4. Je 20 µl Acylierungsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** mischen.

   Bitte beachten: Das Acylierungsreagenz kann mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschälchen, reagieren. Es reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen! Bitte Multipetten o.ä. verwenden, das Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und Vertiefung für Vertiefung pipettieren
5. Reaktionsplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren. Farbe wechselt zu grün.

Je 20 µl der so vorbereiteten Proben werden in den Serotonin-ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

7.1 Proben-Inkubation

Jeweils 20 µl vorbereitete Standards 1 bis 6, 20 µl der vorbereiteten Kontrollen und 20 µl der vorbereiteten Proben (vorzugsweise als Doppelbestimmungen) in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.

Je 100 µl Antiserum in alle Vertiefungen pipettieren.

30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren.

7.2 Waschen

Vertiefungen entleeren, mit ca. 250 µl Waschpuffer füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 3 - 4 mal durchführen.

7.3 Konjugat-Inkubation

Jeweils 100 µl Enzymkonjugat in die Vertiefungen pipettieren.
15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren.

7.4 Waschen

Wie unter Punkt 7.2 beschrieben.

7.5 Substrat-Inkubation

Jeweils 100 µl Substrat in die Vertiefungen pipettieren und
15 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (unter Schütteln).

7.6 Stoppen der Substrat-Inkubation

Jeweils 100 µl Stopplösung in die Vertiefungen pipettieren; dabei die gleiche Reihenfolge und den gleichen Zeittakt einhalten wie bei Zugabe der Substratlösung.

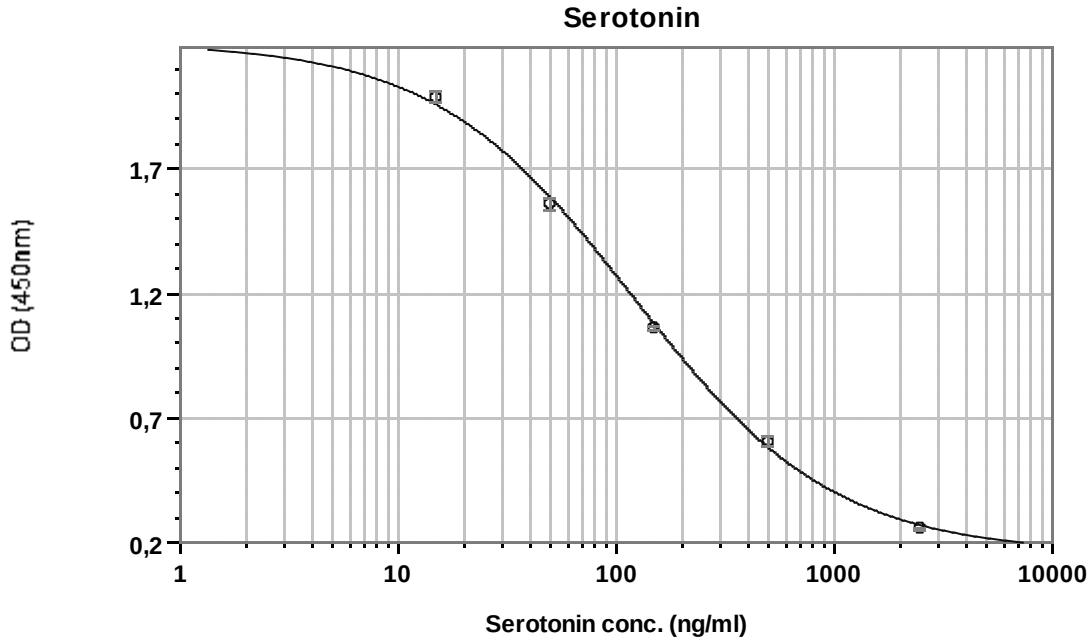
7.7 Messung

Streifen im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Meßwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

8. Auswertung und Beurteilung

Die OD-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 abgelesenen Werte für die Plasma-Proben müssen durch den Faktor 1,8 geteilt werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve.



Standard	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	15	50	150	500	2.500
nmol/ l	0	85,1	284	851	2.838	14.188

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

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 (Frauen)	80 - 450 ng/ml
Serum (Männer)	40 - 400 ng/ml
Urin	50 - 250 µg/Tag
Plasma	< 10 ng/ml

9.2 Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Serum, Urin	4,7	OD_{Cal1} - 2xSD
Plasma	2,6	OD_{Cal1} - 2xSD

9.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	ED-50-Wert (ng/ml)	Kreuzreaktivität (%)
Serotonin	133	100
Tryptamin	8.700	1,5
5-Methoxytryptamin	56.900	0,23
Melatonin	> 1.000.000	< 0,0133
5-Hydroxy-L-Tryptohan	> 1.000.000	< 0,0133
5-HIAA	> 10.000.000	< 0,00133
L-Tryptohan	> 10.000.000	< 0,00133

9.4 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Serum	70 - 824	95	85 - 105
Urin	27 - 1085	105	83 - 120
Plasma	62 - 293	96	87 - 102

9.5 Linearität (Wiederfindung nach Verdünnung mit dest. Wasser)

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verdünnung	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Serum	60 - 1203	1 : 20	91	83 - 97
Urin	66 - 1316	1 : 20	100	96 - 104
Plasma	79 - 395	1 : 5	94	90 - 97

9.6 Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk (%)
Serum	148 – 497	7,3 - 6,9
Urin	93 – 209	6,7 - 6,1
Plasma	163	7,7

9.7 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Vergleich mit den Referenzbereichen (9.1) und den Methodenvergleichen (9.7) festgestellt.

9.8 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.

9.9 Interferenzen

Hämolytische und lipämische Proben sollten im Assay nicht eingesetzt werden.

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 CentralNervous System Circuitry Relatedto Some Cardiorespiratory,Vascular, and HematologicalDisorders
  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 Serotoninin Patients with Combat-Related Posttraumatic Stress Disorder
  BIOL PSYCHIATRY. 45:840–845

- Ernberg, M.; Lundeberg, 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

Pipettierschema

Probenvorbereitung

		Standards	Kontrolle	Serum, Urin	Plasma
Standard 1- 6	µl	20			
Kontrolle 1 & 2	µl		20		
Serum, Urin	µl			20	
EDTA-Plasma	µl				40
Acyl. Puffer	µl	20	20	20	20
Ausgleichsreagenz	µl	200	200	200	200

Platte für 10 Sekunden schütteln

Acyl. Reagenz	µl	20	20	20	20

Sofort mischen und 15 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Jeweils 20 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA

		Standard	Kontrolle	Patienten-Proben
Standard 1-6	µl	20		
Kontrolle 1 & 2	µl		20	
Patientenprobe	µl			20
Antiserum	µl	100	100	100

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

3 - 4 x Waschen

Enzymkonjugat	µl	100	100	100

15 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

3 - 4 x Waschen

Substrat	µl	100	100	100

15 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung	µl	100	100	100

Messung der Extinktion bei 450 nm