



Arbeitsanleitung

Serotonin - ELISA

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

CE

IVD

REF	SER00
Σ	96
$+2$ \uparrow $+8$ °C	2 – 8 °C

 WESAMIN GmbH & Co.KG /
Gesellschaft für die Entwicklung und Produktion von diagnostischen Artikeln mbH
Graff 1 • 24568 Oersdorf • Tel 04191-722 68 65 • Fax 04191-722 68 67
E-Mail: kontakt@wesamin.de • Internet: www.wesamin.de

Version 6, Feb 2020

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-, 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 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.
- 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.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten 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.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in *4. Inhalt des Testbestecks* und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden, diese können Reizungen und Verätzungen verursachen.





- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

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. Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6.1 geregelt.

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

4. Inhalt des Testbestecks

4.1	Mikrotiterstreifen Je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit Serotonin	STRIPS		12 Stück	
4.2	Standards 1 - 6 Je 4 ml, gebrauchsfertig	CAL 1 - 6		6 Fläschchen	
4.3	Kontrolle 1 & 2 Je 4 ml, gebrauchsfertig; Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat	CON 1 & 2		2 Fläschchen	
4.4	Acylierungspuffer 3 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt, reizend	ACYL-BUFF	 Achtung	1 Fläschchen	
4.5	Acylierungsreagenz 2,5 ml, gebrauchsfertig, enthält DMSO und DMF	ACYL-REAG	 Gefahr	 Achtung	1 Fläschchen
4.6	Antiserum 11 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acylserotonin	AS		1 Fläschchen	
4.7	Enzymkonjugat 12 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ	 Achtung	1 Fläschchen	
4.8	Waschpuffer 20 ml, Konzentrat (50x)	WASH		1 Fläschchen	
4.9	Substrat 12 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	SUB		1 Fläschchen	
4.10	Stopplösung 12 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3 M Schwefelsäure	STOP		1 Fläschchen	

4.11	Reaktionsplatte für die Acylierung	ACYL-PLATE	1 Stück
4.12	Ausgleichsreagenz lyophilisiert, mit 20,5 ml dest. Wasser lösen	EQUA-REAG	1 Fläschchen

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 40, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Zentrifuge

5. Probengewinnung

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

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Serum und Plasma

Für den Test kann 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 Serotoninkonzentration auf die Anzahl der Thrombozyten in der Probe bezogen werden. Da die Herstellung thrombozytenfreien Plasmas spezielle Vorsichtsmaßnahmen erfordert, empfehlen wir Serum statt Plasma zu verwenden.

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.

Urin

Es kann sowohl Spontanurin als auch Sammelurin verwendet werden. Zur Gewinnung des Sammelurins wird der gesamte Urin, der während einer Periode von 24 Stunden ausgeschieden wird, in einem Behälter, der 10 - 15 ml 6 M Salzsäure als Konservierungsmittel enthält, gesammelt. 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. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert werden.

Urine vor Gebrauch mischen und zentrifugieren.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG**

Inhalt des Fläschchens mit 20,5 ml destilliertem Wasser lösen, kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

Waschpuffer **WASH**

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, kurz mischen.

Der verdünnte 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.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Probenvorbereitung (Acylierung)

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

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

1. **20 µl Standard 1 - 6, 20 µl Kontrolle 1 & 2, 20 µl Serum, 20 µl Urin und 40 µl Plasma** in die entsprechenden Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettieren.
2. **20 µl Acylierungspuffer** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. **200 µl Ausgleichsreagenz** in alle Vertiefungen pipettieren.
Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
4. Bitte beachten: Acylierungsreagenz reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschälchen. Acylierungsreagenz reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.
Bitte Multipetten oder Ähnliches verwenden, das Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und pipettieren.
20 µl Acylierungsreagenz in alle Vertiefungen pipettieren und **sofort** mit Punkt 5. fortfahren.
5. 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
Farbe wechselt zu grün.

20 µl werden im ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung ELISA

1. **20 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren.
2. **100 µl Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren.
3. 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
Alternative: Platte kurz per Hand schütteln und 45 Minuten ohne schütteln inkubieren.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem 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 4 mal durchführen.
Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
5. **100 µl Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
6. 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
Alternative: Platte kurz per Hand schütteln und 20 Minuten ohne schütteln inkubieren.
7. Waschen: Wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. 15 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
Alternative: Platte kurz per Hand schütteln und 15 ± 5 Minuten ohne schütteln inkubieren.
10. **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

8. Auswertung und Beurteilung

Standard	1	2	3	4	5	6
ng / ml	0	15	50	150	500	2500
nmol / l	0	85,1	284	851	2838	14188

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

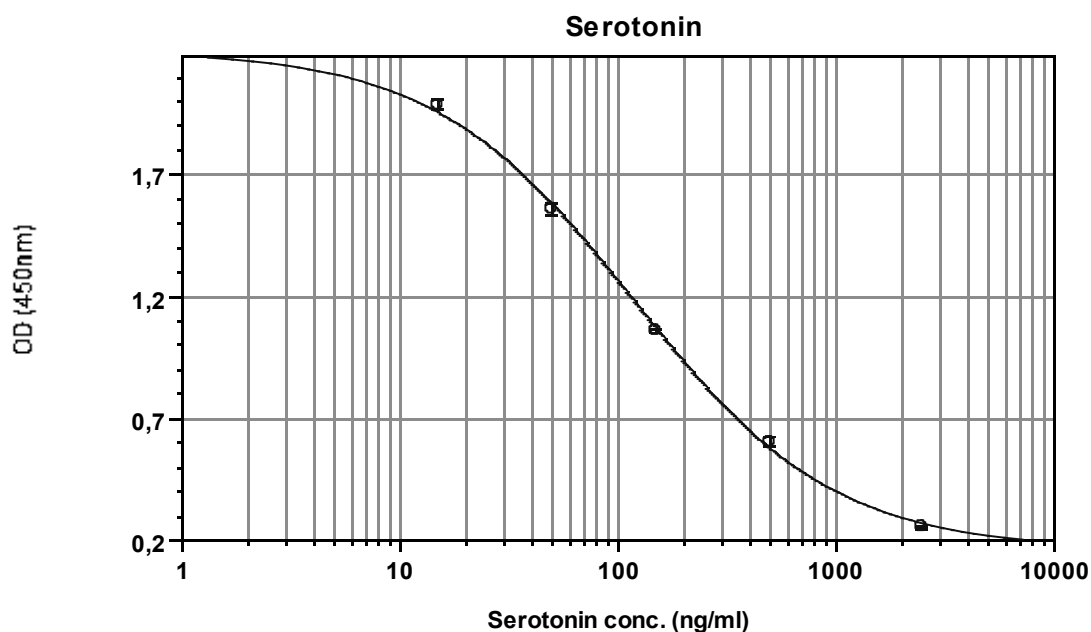
Die ODs (optische Dichten) der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen (Alternativ: Cubic-Spline oder Logit-Log).

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

Die abgelesenen Werte für die Plasmaproben müssen durch den Faktor 1,8 geteilt werden.

Die Abbildung zeigt ein typisches Beispiel:



$$y = \left(\frac{A - D}{1 + (x/C)^B} \right) + D$$

Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	A	B	C	D	R ²
	2,205	0,947	119,181	0,159	0,999

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 (Frauen)	80 - 450 ng/ml
Serum (Männer)	40 - 400 ng/ml
Urin	50 - 250 µg/Tag
Plasma (thrombozytenfrei)	< 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	Kreuzreaktivität (%)
Serotonin	100
Tryptamin	1,5
5-Methoxytryptamin	0,23
Melatonin	< 0,0133
5-Hydroxy-L-Tryptohan	< 0,0133
5-HIAA	< 0,00133
L-Tryptohan	< 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 Verd.	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	Bereich (ng/ml)	Inter-Assay-Vk
Serum	148 - 497	7,3 - 6,9 %	84 - 434	7,5 - 5,2 %
Urin	93 - 209	6,7 - 6,1 %	83 - 351	6,6 - 10,2 %
Plasma	163	7,7 %	31 - 108	6,4 - 8,2 %

9.7 Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Serum	HPLC	$Y = 1,10 \times \text{HPLC} - 10$; $R = 0,994$; $N = 24$
Serum	Elisa A	$Y = 0,85 \times \text{ELISA A} + 11$; $R = 0,987$; $N = 24$
Urin	HPLC	$Y = 0,91 \times \text{HPLC} + 23$; $R = 0,991$; $N = 20$
Urin	Elisa A	$Y = 1,09 \times \text{ELISA A} + 17$; $R = 0,986$; $N = 20$
Plasma	Elisa A	$Y = 0,95 \times \text{ELISA A} - 9$; $R = 0,966$; $N = 20$
Plasma	Elisa B	$Y = 1,33 \times \text{ELISA B} - 24$; $R = 0,957$; $N = 20$

9.8 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.

9.9 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.

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.; 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

11. Verwendete Symbole


 In-Vitro-Diagnostikum

 Inhalt


 Chargenbezeichnung


 Hersteller


 Bestellnummer

 CE markiert

 Verwendbar bis

 Temperaturbegrenzung

 Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

 Gebrauchsanweisung beachten

Pipettierschema Probenvorbereitung

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

Platte 10 Sekunden schütteln

Acyl. Reagenz	µl	20	20	20	20
----------------------	----	----	----	----	----

Sofort 15 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

20 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema ELISA

		Standard	Kontrolle	Probe
Acyl. Standard	µl	20		
Acyl. Kontrolle	µl		20	
Acyl. Probe	µl			20
Antiserum	µl	100	100	100

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Enzymkonjugat	µl	100	100	100
----------------------	----	-----	-----	-----

15 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

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