



IMMUNOASSAYS AND SERVICES

BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

**Будь ласка, використовуйте лише дійсну версію Інструкції з користування,
що надається разом із набором**

**Інструкція з використання
Серотонін ELISA (експрес-метод)**

BA E-8900

**Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленко,
буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com**

1. Введення

1.1. Призначення та принцип тесту

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення серотоніну в сироватці крові, сечі та тромбоцитах.

На першому етапі серотонін кількісно ацильований.

Наступний конкурентний ELISA-комплект використовує формат мікропланшета. Антиген пов'язаний із твердою фазою мікропланшета. Ацильовані стандарти, контролю та зразки та зв'язана тверда фаза аналізу конкурують за фіксовану кількість сайтів антисироватки. Після того, як система знаходиться в рівновазі, вільний антиген та вільні антиген-антисептидні комплекси видаляють шляхом промивки. Антитіло, пов'язане з твердою фазою, виявляється кон'югатом анти-кролика IgG-пероксидази, використовуючи ТМБ як субстрат. Реакція спостерігається при 450 нм.

Кількісна оцінка невідомих зразків досягається шляхом порівняння їх поглинання з еталонною кривою, приготованою з відомими стандартними концентраціями.

1.2 Клінічне застосування

Серотонін (5-гідрокситриптамін) є проміжним продуктом триптофанового обміну і розташований в першу чергу в ентерохромафінових клітинах кишечника (ЕС-клітини), серотонінергічних нейронах головного мозку, тромбоцитах крові, добре зарекомендував себе як нейротрансмітер в центральній нервовій системі. Виробництво ЕС-клітин налічує 80% вмісту серотоніну в організмі. Серотонін переважно метаболізується до 5-гідроксііндолацетатної кислоти (5-ГІАА), яка виділяється нирками.

Майже весь серотонін у циркулюючій крові концентрується в тромбоцитах. Змінені концентрації циркулюючого серотоніну були залучені в кілька патологічних станів, включаючи хронічну напругу, головний біль, шизофренію, гіпертонію, хворобу Хантінгтона, м'язову дистрофію Дюшенна та ранній гострий апендицит.

Визначення рівня сироваткового серотоніну має велике клінічне значення для діагностичної оцінки карциноїдного синдрому. Зростання інтересу до визначення серотоніну в тромбоцитах, включаючи поглинання вивільнену кінетику, очікується в найближчому майбутньому.

Терапевтичні наслідки ніколи не повинні ґрунтуватися на лабораторних результатах, навіть якщо всі результати тестів є в угоді з пунктами "Процедурні застереження, інструкції та попередження". Будь-який лабораторний результат є лише частиною загальної клінічної картини пацієнта.

Тільки в тих випадках, коли лабораторні результати є в прийнятній згоді з загальною клінічною картиною хворого, їх можна використовувати для терапевтичних наслідків.

Сам результат випробувань ніколи не повинен бути єдиним детермінантом для виявлення будь-яких терапевтичних наслідків.

2. Процедурні застереження, інструкції, попередження та обмеження

2.1 Процедурні застереження, рекомендації та попередження

(1) Цей набір призначений тільки для професійного використання. Користувачі повинні мати глибоке розуміння цього протоколу для успішного використання цього набору. Лише інструкція аналізу, що надається з набором, дійсна і повинна бути використана для прогону аналізу. Надійна продуктивність буде досягнута лише шляхом суворого та ретельного дотримання вимог наданої інструкції.

(2) Цей аналіз було підтверджено для певного виду зразка, як зазначено в *Призначенні і принципі тесту* (див. Розділ 1). Будь-яке непридатне використання даного набору є відповідальністю користувача, а виробник не може нести відповідальність в такому разі.

(3) Необхідно дотримуватися принципів належної лабораторної практики (GLP).

- (4) Щоб зменшити вплив потенційно шкідливих речовин, одягайте лабораторні рукавички, одноразові захисні рукавички та захисні окуляри, коли необхідно.
- (5) Реактиви та зразки всіх комплектів повинні бути доведені до кімнатної температури та змішані м'яко, але ретельно перед використанням. Уникайте повторного заморожування та відтавання реагентів та зразків.
- (6) Для розведення або відновлення використовують деіонізовану, дистильовану або ультрачисту воду.
- (7) Мікропланшет містить стріпи, що відламуються. Незастосовувані лунки повинні зберігатись при температурі від 2 ° C до 8 ° C у герметичним пакеті з фольги з осушувачем і використовуються в наданім тримачі.
- (8) Дублююче визначення зразків настійно рекомендується для того, щоб бути в змозі визначити потенційні помилки для прокапування.
- (9) Після початку випробування всі кроки повинні бути завершені без перерви. Переконайтеся, що необхідні реагенти, матеріали та прилади готуються в належний час.
- (10) Час інкубації впливає на результати. Всі лунки слід обробляти в тому ж порядку і інтервалі часу.
- (11) Щоб уникнути перехресного забруднення реагентів, використовуйте нові одноразові наконечники піпеток для дозування кожного реагенту, зразку, стандарту і контролю.
- (12) Калібрувальна крива повинна бути встановлена для кожного пробігу.
- (13) Контроль повинен бути включений в кожний прогін та відповідати встановленим межам довіри. Межі довіри наведені в звіті про контроль якості.
- (14) Не змішуйте компоненти набору з різними номерами партії в рамках тесту і не використовуйте реагенти за межами терміну придатності, як показано на етикетках комплектів.
- (15) Уникайте контакту з стоп розчином, що містить 0,25 M H₂SO₄. Це може спричинити подразнення шкіри та опіки. У випадку контакту з очима або шкірою, змити з водою негайно.
- (16) Субстрат ТМБ має подразнюючу дію на шкіру та слизову оболонку. У разі можливого контакту мийте очі з рясним об'ємом води і шкіру з милом і великою кількістю води. Промити забруднені об'єкти перед їх повторним використанням.
- (17) Інформацію про небезпечні речовини, включені в комплект, наведено в Паспортах з безпеки (SDS). Паспорт безпеки даних для цього продукту доступний безпосередньо на веб-сайті виробника або за запитом.
- (18) Очікувані еталонні значення, зазначені в цій інструкції з випробувань, є лише показовими. Рекомендується кожній лабораторії встановлювати власні контрольні інтервали.
- (19) Результати, отримані в цьому тестовому наборі, не повинні вважатися єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків, але вони повинні співвідноситися з іншими діагностичними тестами та клінічними спостереженнями.
- (20) Реактиви набору мають розглядатися як небезпечні відходи та повинні бути утилізовані відповідно до національних правил.

2.2 Обмеження

Будь-яка невідповідне обертання зразків або модифікація цього випробування може вплинути на результати.

2.2.1. Впливаючі речовини

Сироватка / плазма

Зразки, що містять осадки або фібринові нитки або які є гемолітичними або ліпемічними, можуть призвести до неточних результатів.

24-годинна сеча

Будь ласка, зверніть увагу на підготовку зразка! Якщо відсоток кінцевої концентрації кислоти занадто високий, це буде призводити до неправильних результатів для зразків сечі.

2.2.2 Вплив ліків

Будь ласка, зверніться до пункту "Збір та зберігання зразків".

2.2.3 Ефект високої дози-Крюк ефект.

У цьому тесті не було виявлено Крюк-ефекту .

3. Зберігання та стабільність

Зберігайте нерозкриті реагенти при температурі від 2 до 8 ° С до закінчення терміну придатності. Не використовуйте компоненти після завершення терміну дії

Дата вказана на наклейках набору. Після відкриття реагенти стабільні протягом 1 місяця при зберіганні при температурі 2 - 8 ° С. Після того, як було відкрито запечатаний багаторазовий пакет, слід приділити увагу, щоб закрити його ретельно з осушувачем знову.

4. Матеріали

4.1 Зміст набору.

BA D-0023 REAC TUBES - Готові до використання

Зміст: Реакційні трубки в закритому пакеті

Об'єм: 2 x 50 пробірок

*) Замість пробірок реакції, також можна використовувати 48 лунок мікропланшета для підготовки та ацилювання зразка (див. Розділ 6.2). Ці пластини (BA D-0033) доступні за запитом.

BE-0030 WASH CONC 50X – промивний буфер концентрований 50x

Зміст: буфер з неіонним миючим засобом і фізіологічним рН

Об'єм: 1 x 20 мл / флакон, світло-фіолетовий ковпачок

BA E-0045 Conjugate – Ферментний кон'югат Готовий до використання

Зміст: козячий анти-кроликовий імуноглобулін, кон'югований з пероксидазою

Об'єм: 1 x 12 мл / флакон, червоний ковпачок

BA E-0055 Substrate - Субстрат Готовий до використання

Зміст: хромогенний субстрат, що містить тетраметілбензидін, буфер субстрату та перекис водню

Об'єм: 1 x 12 мл / флакон, чорний ковпачок

BA E-0080 Stop – Soln стоп –розчин Готовий до використання

Зміст: 0,25 М сірчаної кислоти

Об'єм: 1 x 12 мл / флакон, світло-сірий ковпачок

Небезпеки



Ідентифікація:

H290 Може бути корозійним до металів.

H314 Викликає сильні опіки шкіри та пошкодження очей.

BA E-0931 Ser 5- HIAA серотонін мікропланшет - готовий до використання

Зміст: 1 x 96 лунок (12x8) антигену, попередньо покритий планшет, у запечатаному багаторазовому пакеті з осушувачем

BA E-8910 Ser- As Серотонін антисерум - Готовий до використання

Зміст: Кролик анти-серотонінове антитіло, синій колір

Об'єм: 1 x 12 мл / флакон, синій ковпачок

Стандарти та контролю - Готові до використання

Кат. №	Компонент	Колір/ковпачок	Концентрація Нг/мл	Концентрація нмоль/л	Обсяг/флакон

BA R 8901	Standart A	білий	0	0	4 мл
BA R 8902	Standart B	світло жовтий	15	85,1	4 мл
BA R 8903	Standart C	помаранчовий	50	284	4 мл
BA R 8904	Standart D	Темно синій	150	851	4 мл
BA R 8905	Standart E	світло сірий	500	2840	4 мл
BA R 8906	Standart F	чорний	2500	14175	4 мл
BA R 8951	Control 1	Світло зелений	Зверніться до етикеток флаконів для очікуваних значень та прийнятного діапазону		4 мл
BA R 8952	Control 2	Темно червоний			4 мл

Конверсія: серотонін (нг / мл) x 5.67 = серотонін (нмоль / л)

Зміст: ТРИС-буфер з не-ртутними консервантами, збагачений певною кількістю серотоніну

BA E-8912 Acyl reag Ацилюючий реагент- Готовий до використання

Зміст: ациліруючий реагент у диметилсульфоксиді

Об'єм: 1 x 3 мл / флакон, зелений ковпачок

BA E-8911 Acyl buff Ацилюючий буфер - Готовий до використання

Зміст: буфер ТРИС з не-ртутним консервантом

Об'єм: 1 x 55 мл / флакон, світло-сірий ковпачок

4.2 Додаткові матеріали та обладнання, необхідні, але не постачаються в наборі

- Калібровані прецизійні піпетки для розподілу об'ємів від 25 до 500мкл
- Пристрій для миття мікропланшетів (ручне, напів-автоматизоване або автоматичне)
- ELISA-рідер, здатний зчитувати абсорбцію при 450 нм і, якщо можливо, 620 - 650 нм
- абсорбуючий матеріал (паперовий рушник)
- Вода (деіонізована, дистильована або ультра-чиста)
- змішувач вихровий

Аналіз можна проводити зі струшуванням або без нього. Якщо використовується шейкер мікропланшета, він повинен мати такі характеристики: амплітуда струшування 3 мм; Прибл. 600 об / хв.

5. Збір та зберігання зразків

Продуктів харчування або рідин, що містять серотонін, такі як ананас, баклажан, авокадо, банани, смородина, ківі, диня, мірабель, сливи, персики, шоколад, агрус, помідори або волоський горіх, треба уникати за 2 дні до і включаючи день збору зразка (24-годинна сеча). Селективний синдром зворотного захоплення серотоніну Інгібітори (СЮЗС) впливають на рівень серотоніну. Люди, які приймають такі ліки, повинні проконсультуватися з лікарем перед збором зразків. Необхідно уникнути повторного заморожування та розморожування зразків.

Сироватка

Збирайте кров за допомогою венепункції (моноветт або вакуум для сироватки), дозволяйте загуститися і розділити сироватку шляхом центрифугування згідно з інструкціями виробника при кімнатній температурі. Не центрифугувати, поки не відбудеться повне згортання. Пацієнти, які отримують антикоагулянтну терапію, можуть вимагати збільшення часу згортання крові.

Гемолітичні та особливо ліпемічні зразки не повинні використовуватися для аналізу.

Зберігання: до 6 годин при температурі від 2 до 8 ° С, протягом тривалого періоду (до 6 місяців) при -20 ° С.

Сеча

Необхідно використати спонтанну або 24-годинну сечу, зібрану у пляшці, що містить 10 - 15 мл 6 М HCl. Визначте загальний обсяг сечі, що виділяється протягом 24 годин, для розрахунку результатів.

Зберігання: до 24 годин при температурі від 2 до 8 ° С, для довших періодів (до 6 місяців) при -20 ° С. Уникати впливу прямих сонячних променів.

Тромбоцити

Понад 98% циркулюючого серотоніну знаходиться в тромбоцитах і виділяється під час згортання крові. Кров слід збирати венепункцією відповідно до інструкцій виробника у пластикові пробірки (Моноветт або вакуум), що містить ЕДТА або цитрат як антикоагулянт. Для отримання тромбоцитарно-багатої плазми (PRP) зразки центрифугують протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (200 x Г). Перемістіть супернатант в іншу пробірку і підрахуйте тромбоцити.

Гранули тромбоцитів отримують шляхом додавання 800 мкл фізіологічного розчину до 200 мкл PRP (що містить від: 350 000 - 500 000 тромбоцитів / мкл) і центрифугуванням (4500 x g, 10 хвилин при 4 ° С). Супернатант є тоді видаленим.

200 мкл води (деіонізованої, дистильованої або ультра-чистої) додається до грануляту і ретельно перемішується на вихровому міксері. Цю суспензію можна зберігати замороженою протягом декількох тижнів при <-20 ° С.

Після відтавання заморожених зразків центрифугувати при 10000 x g протягом 2 хвилин при кімнатній температурі. 25 мкл супернатанта використовують для реакції ацилювання.

Для визначення серотоніну в бідних тромбоцитах плазмі та цереброспінальній рідині слід використовувати серотонін дослідження™ ELISA (для отримання детальної інформації зверніться до місцевого постачальника) .

6. Процедура тестування сироватки, сечі та тромбоцитів

Довести всі реагенти та зразки до кімнатної температури. Вимірювання в дублікатах рекомендовано . Перед використанням рекомендується пронумерувати стріпи мікропланшету, щоб уникнути будь-якого змішування.

Зв'язування антитіла та ферментних кон'югатів та активність використовуваного ферменту є температурно залежними, і значення затухання можуть відрізнятися, якщо термостат не використовується. Чим вище температура, тим вище значення затухання буде. Відповідні варіанти також стосуються часу інкубації. Оптимальна температура під час проведення імуноферментного аналізу становить 20-25 ° С.

6.1. Приготування реагентів

Промивний буфер

Розвести 20 мл концентрату промивного буферу з водою (деіонізованою, дистильованою або ультра чистою) до кінцевого об'єму 1000 мл.

Зберігання: 1 місяць при 2 - 8 ° С

Ацилюючий реагент

Ацилюючий реагент (ВА Е-8912) має температуру замерзання 18,5 ° С. Переконайтеся, що ацилюючий реагент є рідиною, коли використовується, необхідно забезпечити, щоб ацилюючий реагент досягав кімнатної температури і утворював однорідний без кристалів розчин, перед використанням

Серотонінові стріпи мікропланшетів

У рідкісних випадках залишки блокуючого та стабілізуючого реагенту можна побачити у лунках як маленькі, білі крапки або лінії. Ці залишки не впливають на якість продукту.

6.2. Приготування препарату та ацилювання сироватки, сечі та тромбоцитів

1. Прокапати 25 мкл стандартів, контролів і сироватки, сечі або тромбоцитів у відповідну пробірку реакції .
2. Во всі пробірки додайте 500 мкл ацилюючого буфера.
3. Во всі пробірки додайте 25 мкл ацилюючого реагенту.
4. Ретельно перемішати та інкубувати протягом 15 хв при кімнатній температурі (20-25 ° С). Візьміть 25 мкл підготовлених стандартів, контролів та зразків для ІФА серотоніну

6.3. ELISA серотонін.

Використання шейкера не є обов'язковим. Альтернативний протокол без шейкерів виділений курсивом та затінений сірим кольором.

1. Прокапайте 25 мкл ацильованих стандартів, контролів та зразків у відповідні лунки мікропланшета серотоніна.
2. Прокапати 100 мкл серотонін антисироватка у всі лунки.
3. Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі (20-25 ° С) на шейкері (приблизно 600 обертів на хвилину). Не використовуйте шейкер: потрясіть серотонін мікропланшет кратко вручну та інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі (20 - 25 ° С).
4. Видаліть або аспіруйте вміст лунок. Промийте пластину 3 х, додаючи 300 мкл промивочного буфера, видаліть вміст і промокнути насухо кожен раз, натискаючи перевернутим мікропланшетом на абсорбуючий папір.
5. Прокапати 100 мкл кон'югату у всі лунки.
6. Інкубуйте протягом 15 хв при кімнатній температурі (20-25 ° С) на шейкері (приблизно 600 обертів на хвилину). Без використання шейкерів: інкубують протягом 15 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° С).
7. Видаліть або аспіруйте вміст свердловин. Промийте пластину 3 х, додаючи 300 мкл промивочного буфера, відкидаючи вміст і промокнути насухо кожен раз, натискаючи перевернутим мікропланшетом на абсорбуючий папір.
8. Прокапати 100 мкл субстрату у всі лунки.
9. Інкубуйте протягом 15 ± 2 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° С) на шейкері (приблизно 600 об / хв).
Без використання шейкерів: інкубують протягом 15 ± 2 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° С). Уникати впливу прямих сонячних променів!
10. Додайте 100мкл стоп-розчину до кожної лунки та струсіть мікропланшет, щоб забезпечити однорідність розподілу розчину.
11. Прочитайте поглинання розчину в лунках протягом 10 хвилин, використовуючи рідер мікропланшета, установлений на 450 нм (якщо це можливо, рекомендується еталонна довжина хвилі від 620 нм до 650 нм).

7. Розрахунок результатів

Діапазон вимірювання	серотонін
	10,2-2500 нг/мл

Калібрувальна крива отримується шляхом побудови показників оптичної абсорбції (обчислення середньої абсорбції) стандартів (лінійна, вісь у) проти відповідних стандартних концентрацій (логарифмічна, вісь х). Використовуйте нелінійну регресію для фіксації кривої (наприклад, сплайн, 4-параметр, акіма).

Цей аналіз є конкурентним аналізом. Це означає: ОЩ-значення зменшуються зі збільшенням концентрації аналіту. Значення ОЩ, виявлені нижче стандартної кривої, відповідають високим концентраціям аналіту у зразку та повинні бути зареєстровані як позитивні.

Концентрації зразків сечі та сироватки можуть бути прочитані безпосередньо з калібрувальної кривої.

Розрахунок серотоніну в тромбоцитах

9

Зміст серотоніну в тромбоцитах відноситься до 10 тромбоцитів.

Ілюстративний приклад:

Вимірювана концентрація серотоніну: 100 нг / мл⁹

Кількість тромбоцитів у ПРП: 300000 / мкл = $0,3 \times 10^9$ тромбоцитів / мл, з вмістом серотоніну в 100 нг.

Результуючий вміст серотоніну в тромбоцитах становить:

$333 \text{ нг} / 10^9 \text{ тромбоцитів} (100 \text{ нг серотоніну} \times 1,0 \times 10^9 / 0,3 \times 10^9)$

Конверсія

Серотонін (нг / мл) $\times 5.67 =$ Серотонін (нмоль / л)

Очікувані довідкові значення

Настійно рекомендується, щоб кожна лабораторія визначала власні контрольні значення.

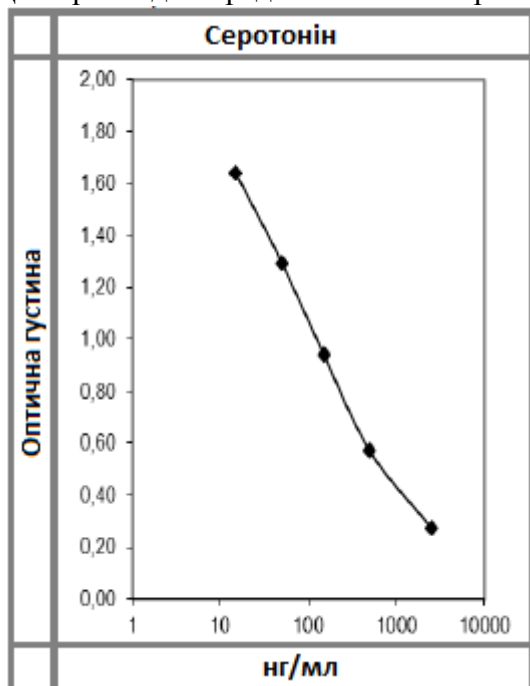
	Серотонін
Сироватка	70 - 270 нг / мл
24-годинна сеча	50 - 250 мкг / 24 години
Серотонін у тромбоцитах	$500 - 950 \text{ нг} / 10^9 \text{ тромбоцитів}$

7.1 Контроль якості

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до національних правил. Використовуйте контролю як звичайного, так і патологічного рівнів. Контролі набору або інші комерційно доступні контролю повинні бути знайдені в межах довіри. Межі довіри контролів набору надруковані на Звіті з контролю якості.

7.2 Типова стандартна крива:

Цей приклад є середнім числом 11 різних тестів; Не використовуйте для розрахунку!



Крива див. оригінал інструкції

8. Характеристики аналізу

чутливість	Межі виявлення (LOD)	6.2 нг / мл
	Ліміт кількісної оцінки (LOQ)	10,2 нг / мл

Аналітична специфічність (перехресна реактивність)	речовина	Перехресна реактивність (%)
	тріптамін	0,05
	мелатонін	0,08
	5-гідроксиіндол оцтова кислота	< 0.014
	преніланін	< 0.014
	гістидін	< 0.019
	тірамін	< 0.018
	5-гідроксітріптофан	< 0.014

Точність							
Intra - аналіз				Inter-Аналіз			
	зразок	Діапазон (нг/мл) середнє ± SD	CV (%)		зразок	Діапазон (нг/мл) середнє +- SD	CV (%)
Серотонін сечі (n=40)	1	140.7 ± 16.3	11,6	Серотонін сечі (n=15)	1	126,1± 14,2	11,3
	2	421,2± 38,6	9,2		2	414,5± 48,6	11,7
	3	1560± 215,3	13,8		3	1343± 200,2	14,9
Серотонін сироваткі (n=20)	1	101,3± 9,6	9,7	Серотонін сироваткі (n=7)	1	83,1± 10,3	12,4
	2	246,8, ± 31,2	12,6		2	244,3± 25,4	10,4
	3	667,5± 71,6	10,8				

лінійність			Діапазон нг/мл	Серійне розведення до	Середня лінійність (%)	Діапазон (%)
	серотонін	сечі	30-3500	1:65	100	88-118
		сироваткі	40-3000	1:33	96	80-113

			Середнє(%)	Діапазон (%)	% відновлення після збагачення
	серотонін	сечі	96	74-105	
		сироватки	108	89-126	

Метод порівняння щодо РІА	Сеча сироватка	$y = 0,94x + 19.58; R_2 = 0,98$ $y = 0,85x + 33.18; R_2 = 0,97$
---------------------------	----------------	--

9. References/Література

- (1) Oliveira et al. Розлади шляху W nt / β -катенину та метаболізм енергії в ранній ХХН: ефект Фосфатні зв'язувальні речовини. Трансплантація з набору нафти, 28 (10): 2510-2517 (2013)
 - (2) Шахін та інші. Виявлення моноамінів плазми та сечі та їх метаболітів у несегментальних Вітіліро. Acta Dermatovenerol Croat, 20 (1): 14-20 (2012)
 - (3) Ciprandi et al. Серотонін при алергічному риніті: можлива роль для поведінкових симптомів, 10 (3): 183-188(2011)
- Для отримання оновленої літератури або будь-якої іншої інформації, будь ласка, зверніться до свого місцевого постачальника.

Умовні позначення:

 <p>Температура зберігання</p>	 <p>Виробник</p>	 <p>Містить достатньо <N> випробувань</p>
 <p>Дата закінчення строку дії</p>	<p>LOT Код партії</p>	<p>IVD Тільки для діагностики в лабораторних умовах!</p>
 <p>Зверніться до інструкції з використання</p>	<p>CONT Зміст</p>	<p>CE Маркіровка</p>

(2)