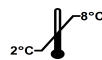


Instructions for use
Serotonin RIA Fast Track

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

REF**BA R-8900****IVD****200 kBq**

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

¹²⁵I – Radioimmunoassay for the quantitative determination of Serotonin in serum, urine, and platelets.

For research use only (RUO) this kit can also be used for cerebrospinal fluid (CSF) and platelet-free plasma (PFP). Please refer to appendix 1.

First, Serotonin is quantitatively acylated.

The assay procedure follows the basic principle of radioimmunoassay, involving competition between a radioactive and a non-radioactive antigen for a fixed number of antibody binding sites. When the system is in equilibrium, the antibody bound radioactivity is precipitated with a second antibody in the presence of polyethylene glycol. After centrifugation and decantation of the supernatant the precipitate is counted in a gamma counter. The amount of ¹²⁵I-labelled antigen bound to the antibody is inversely proportional to the analyte concentration of the sample. Quantification of unknown samples is achieved by comparing their activity with a reference curve prepared with known standards.

1.2 Clinical application

Serotonin (5-hydroxytryptamine) is an intermediate product of tryptophan metabolism and is located primarily in the enterochromaffin cells of intestine (EC-cells), serotonergic neurons of the brain, platelets of the blood and is well established as a neurotransmitter in the central nervous system. EC-cell production accounts for 80% of the body's serotonin content. Serotonin is predominately metabolized to 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), which is excreted by the kidneys.

Nearly all of the serotonin in circulating blood is concentrated in platelets. Altered concentrations of circulating serotonin have been implicated in several pathological conditions including chronic tension, headache, essential hypertension, schizophrenia, hypertension, Huntington's disease, Duchenne's muscular dystrophy and early acute appendicitis.

The determination of serum serotonin levels is of high clinical significance for diagnostic assessment of carcinoid syndrome. An increasing interest in the determination of serotonin in platelets including uptake and release kinetics is expected in the near future.

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as under point "Procedural cautions, guidelines and warnings". Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of the patient.

Only in cases where the laboratory results are in an acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient it can be used for therapeutic consequences.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations

2.1 Precautions, guidelines and warnings

- (1) This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and has to be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for a certain type of sample as indicated in *Intended Use* (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) All kit reagents - with the exception of Precipitating Reagent - and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (6) For the dilution or reconstitution purposes use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (7) The radioactive material (¹²⁵Iodine, half life 60 days, emitting ionizing X-radiation with 28 keV and G-radiation with 35.5 keV) may be received, acquired, possessed and used only by physicians, laboratories or hospitals. Products are dispatched on the basis of the nuclear and radiation protection regulations.
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (9) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.
- (10) Incubation times do influence the results. All tubes should be handled in the same order and time intervals.
- (11) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (12) A standard curve must be established for each run.

- (13) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report.
- (14) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (15) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (16) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (17) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
- (18) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed according to national regulations.

2.2 Limitations

Any inappropriate handling of samples or modification of this test might influence the results.

2.2.1 Interfering substances

Serum/Plasma

Samples containing precipitates or fibrin strands might cause inaccurate results.

Hemolytic samples (up to 4 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 50 mg/dl bilirubin) and lipemic samples (up to 1600 mg/dl triglycerides) have no influence on the assay results.

24-hour urine

Please note the sample preparation! If the percentage of the final concentration of acid is too high, this will lead to incorrect results for the urine samples.

2.2.2 Drug interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of Serotonin level in the sample.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

Store the unopened reagents at 2 - 8 °C until expiration date. Do not use components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened the reagents are stable for 1 month when stored at 2 - 8 °C.


4. Materials

4.1 Content of the kit

BA R-8910  **Serotonin Antiserum** - Ready to use


Content: Rabbit anti-serotonin antibody, blue coloured

Volume: 1 x 5.25 ml/vial, blue cap

BA R-0920  **¹²⁵I - Serotonin** - Ready to use

Content: ¹²⁵I labeled Serotonin, red coloured

Volume: 1 x 5.5 ml/vial, orange cap

Hazards identification:  Radioactive, activity < 200 kBq

BA R-8912  **Acylation Reagent** - Ready to use

Content: Acylation reagent in dimethylsulfoxide and dimethylformamide

Volume: 1 x 3 ml/vial, green cap

Hazards identification:   

H226 Flammable liquid and vapour.
H360D May damage the unborn child.
H312 + H332 Harmful in contact with skin or if inhaled.
H319 Causes serious eye irritation.

BA R-8911 **ACYL-BUFF** **Acylation Buffer** - Ready to use

Content: TRIS buffer with non-mercury preservative

Volume: 1 x 30 ml/vial, light grey cap

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration ng/ml	Concentration nmol/l	Volume/Vial
BA R-8901	STANDARD A	white	0	0	4 ml
BA R-8902	STANDARD B	light yellow	15	85.1	4 ml
BA R-8903	STANDARD C	orange	50	284	4 ml
BA R-8904	STANDARD D	dark blue	150	851	4 ml
BA R-8905	STANDARD E	light grey	500	2 835	4 ml
BA R-8906	STANDARD F	black	2 500	14 175	4 ml
BA R-8951	CONTROL 1	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!		4 ml
BA R-8952	CONTROL 2	dark red			4 ml

Conversion: Serotonin (ng/ml) x 5.67 = Serotonin (nmol/l)

Content: TRIS buffer with non-mercury preservative, spiked with defined quantity of serotonin

BA R-0025 **PREC-REAG** **Precipitating Reagent** - Ready to use

Content: Goat anti-rabbit serum in PEG phosphate buffer

Volume: 1 x 55 ml/vial, white cap

4.2 Additional materials and equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 25 - 2000 µl
- Plastic tubes (polypropylene, polystyrene) and suitable rack
- Centrifuge (preferable refrigerated) capable of at least 3,000 x g
- Suitable device for aspirating or decanting the tubes
- Vortex mixer
- Gamma counter
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Absorbent paper (paper towel)

5. Sample collection and storage

Foods or liquids containing serotonin such as pineapple, eggplant, avocados, bananas, currants, kiwis, melon, mirabelles, plums, peaches chocolate, gooseberries, tomatoes, or walnuts, should be avoided 2 days before and including the day of the sample collection (24-hour urine). Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) influence serotonin levels. People who are taking such medications should consult with their doctor before specimen collection.

Repeated freezing and thawing of the samples should be avoided.**Serum**

Collect blood by venipuncture (Monovette™ or Vacuette™ for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation (according to manufacturer's instructions). Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Haemolytic, icteric and lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: up to 24 hours at 2 - 8 °C, for longer period (up to 6 month) at -20 °C.

Urine

Spontaneous or 24-hour urine, collected in a bottle containing 10 - 15 ml of 6 M HCl, should be used.

Determine the total volume of urine excreted during a period of 24 h for calculation of the results.

Storage: for longer periods (up to 6 months) at -20 °C.

Avoid exposure to direct sunlight.

Platelets

More than 98 percent of the circulating serotonin is located in the platelets and is released during blood clotting. Blood must be collected by venipuncture in plastic tubes (Monovette™ or Vacuette™) containing EDTA or Citrate as anticoagulant.

To obtain platelet-rich plasma (PRP) the samples are centrifuged for 10 minutes at room temperature (200 x g). Transfer the supernatant to another tube and count the platelets.

The platelet pellet is obtained by adding 800 µl of physiological saline to 200 µl of PRP (containing between 350,000 – 500,000 platelets/µl) and centrifugation (4,500 x g, 10 minutes at 4 °C). The supernatant is then discarded.

200 µl of water (deionized, distilled, or ultra-pure) is added to the pellet and mixed thoroughly on a vortex mixer. This suspension can be stored frozen for several weeks at -20 °C.


After thawing of the frozen samples, centrifuge at 10,000 x g for 2 minutes at room temperature.

25 µl of the supernatant is used for the acylation reaction.


6. Test procedure

For research use only (RUO) this kit can also be used for cerebrospinal fluid (CSF) and platelet-free plasma (PFP). Please refer to appendix 1.

Allow all reagents – with the exception of Precipitating Reagent - to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the assay tubes (**polystyrene or polypropylene**) accordingly. Duplicate determinations are recommended.

 Pipetted liquids should not adhere to the wall of the RIA tubes. If necessary please centrifuge tubes for 1 minute at 500 x g to spin down adhering liquids. Do not use glass tubes for the assay!

6.1 Sample preparation and acylation for serum, urine and platelets

1.	Pipette 25 µl of standards, controls, serum, urine and platelets into the respective tubes .
2.	Add 250 µl Acylation Buffer to all tubes .
3.	Add 25 µl of Acylation Reagent to all tubes .
4.	Mix thoroughly and incubate for 30 min at RT (20 - 25 °C).
5.	Pipette 2 ml of water (deionized, distilled, or ultra-pure) into all tubes and mix thoroughly (vortex).
	Take 25 µl of the acylated standards, controls and samples for the Serotonin RIA

6.2 Serotonin RIA

1.	Pipette 25 µl of prepared Standard A into the tubes for the NSB .
2.	Pipette 25 µl of prepared standards, controls and samples into the respective tubes .
3.	Pipette 50 µl of the ¹²⁵I Serotonin into all tubes .
4.	Pipette 50 µl of Serotonin Antiserum into all tubes (except totals and NSB) ; mix thoroughly (vortex).
5.	Cover tubes . Incubate for 90 min at 2 - 8 °C .
6.	Mix the chilled (2 - 8 °C) Precipitating Reagent thoroughly, pipette each 500 µl into all tubes (except totals) , and mix on a vortex.
7.	Incubate for 15 min at 2 - 8 °C .
8.	Centrifuge for 15 min at 3,000 x g , if possible in a refrigerated centrifuge.
9.	Decant or aspirate the supernatant carefully (except totals) . Blot the tubes dry and leave them upside down for 2 minutes.
10.	Count all tubes for 1 min in a gamma counter.


7. Calculation of results

Measuring range	Serotonin
	6.7 – 2 500 ng/ml

Subtract the mean cpm of the non-specific binding NSB from the mean cpm of standards, controls and samples.

The standard curve from which the concentrations in the samples can be read off, is obtained by plotting the percentage of (B-NSB)/ (B0-NSB) measured for the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis).

Use a non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).

 This assay is a competitive assay. This means: the counts are decreasing with increasing concentrations of the analyte. Counts found below the standard curve correspond to high concentrations of the analyte in the sample and have to be reported as being positive.

The concentrations for **serum, urine, platelets** and **controls** can be read directly from the standard curve.

Calculation of serotonin in platelets

The content of serotonin in platelets is referred to 10^9 platelets.

Example:

Measured Serotonin concentration: 100 ng/ml

Number of the platelets in the PRP: $300.000 / \mu\text{l} = 0.3 \times 10^9$ platelets/ml with a serotonin content of 100 ng.
 The resulting serotonin content in the platelets is 333 ng/ 10^9 platelets.
 (100 ng serotonin $\times 1.0 \times 10^9 / 0.3 \times 10^9$)

Conversion

Serotonin (ng/ml) $\times 5.67 =$ Serotonin (nmol/l)

Expected reference values


It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference values.

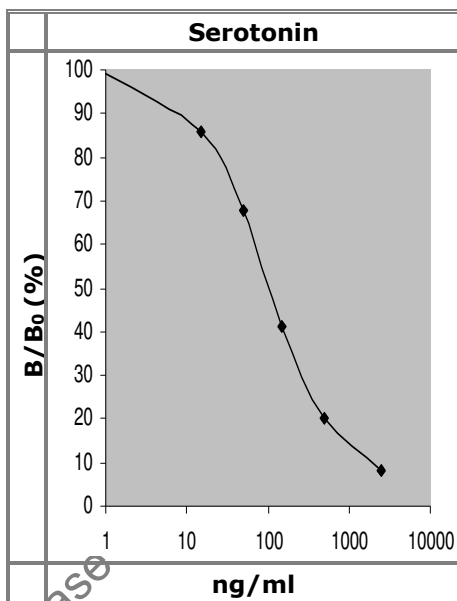
	Serotonin
Serum	70 - 270 ng/ml
24-hour urine	50 - 250 $\mu\text{g}/24\text{h}$
Serotonin in platelets	500 - 950 ng/ 10^9 platelets

7.1 Quality control

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. The kit or other commercially available, controls should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC-Report.

7.2 Typical standard curve

 Example, do not use for calculation!



8. Assay characteristics

Sensitivity	Limit of Detection (LOD)	6.6 ng/ml
	Limit of Quantitation (LOQ)	10.5 ng/ml

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)
		Serotonin
	Serotonin	100
	Tryptamine	3.64
	Melatonin	0.06
	5-Hydroxyindole acetic acid	<0.01
	5-Hydroxy-2-carboxylic acid	<0.01
	Phenylalanine	<0.01
	Histidine	<0.01
	Tyramine	<0.01
	5-Hydroxytryptophan	<0.01
	Tyrosine	<0.01

Precision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Sample	Range (ng/ml)	CV (%)		Sample	Range (ng/ml)	CV (%)
Urine	1	106 ± 12.4	11.7	Urine	1	128 ± 16.3	12.8
	2	401 ± 44.0	11.0		2	174 ± 15.8	9.1
	3	1373 ± 100	7.3		3	358 ± 26.1	7.3
Serum	1	253 ± 10.5	4.2	Serum	1	86.7 ± 5.9	6.8
	2	164 ± 9.7	5.9		2	144 ± 11.4	7.9
					3	363 ± 21.5	5.9

Linearity			Range	Serial dilution up to	Range (%)
	Serotonin	Urine	55 – 1 029 ng/ml	1:21	89 – 116
		Serum	48 – 981 ng/ml	1:21	81 – 102

Recovery			Mean (%)	Range (%)	% Recovery after spiking
	Serotonin	Urine	88	83 – 94	
		Serum	98	90 – 107	







Method Comparison versus ELISA*		Urine	ELISA = 1.49 RIA – 44.03	R ² = 0.99; n = 19
* ELISA Immunotech		Serum	ELISA = 1.25 RIA – 20.09	R ² = 0.99; n = 20

9. References/Literature

- (1) Peng et al. Role of 5-hydroxytryptamine expression in cerebellar Purkinje cells in obstructive sleep apnea syndrome. *Neural Regeneration Research*, 7(8):606-610 (2012)
- (2) Wozniak et al. Serotonin and Neuron-specific Enolase: Serum Acute Mid-term Levels and their Association With Posttraumatic Depression. *Neurosurgery Quarterly*, 20(4):297-303 (2010)
- (3) Tan et al. Circadian rhythm of salivary serotonin in patients with major depressive disorder *Neuroendocrinology Letters* 28(4):101-106 (2007)

⚠ **For updated literature or any other information please contact your local supplier.**

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	LOT	Batch code	IVD	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE labelled
	Caution	REF	Catalogue number		

APPENDIX 1: – For research use only (RUO) –

Protocol for the quantitative determination of Serotonin in **cerebrospinal fluid (CSF) and platelet-free plasma (PFP)**

1. Sample collection and storage

Platelet-free plasma (PFP)


First, a platelet-rich plasma (PRP) is prepared by centrifugation of plasma (EDTA or citrate) for 10 minutes at room temperature (200 x g) and then the supernatant is transferred to another tube. To measure serotonin in **platelet-free plasma (PFP)**, an aliquot of the supernatant (**PRP**) is centrifuged at 4,500 x g for 10 minutes at 4 °C. This platelet-free plasma can be stored at -20 °C for up to two weeks.

Cerebrospinal fluid (CSF)


CSF should be stored at -20 °C.

2. Test procedure

Allow all reagents – with the exception of Precipitating Reagent - to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the assay tubes (**polystyrene or polypropylene**) accordingly. Duplicate determinations are recommended.

 *Pipetted liquids should not adhere to the wall of the RIA tubes. If necessary please centrifuge tubes for 1 minute at 500 x g to spin down adhering liquids. Do not use glass tubes for the assay!*

2.1 Sample preparation and acylation

1.	Pipette 25 µl of standards and controls , 100 µl of cerebrospinal fluid (CSF) and platelet-free plasma (PFP) into the respective tubes.
2.	Pipette 250 µl Acylation Buffer into the tubes for standards and controls and 50 µl into the tubes for CSF and PFP .
3.	Pipette 25 µl of Acylation Reagent into the tubes for standards and controls and 5 µl into the tubes for CSF and PFP .
4.	Mix thoroughly and incubate for 30 min at RT (20 - 25 °C).
5.	Pipette 2 ml of water (deionized, distilled, or ultra-pure) into the tubes for standards and controls and 300 µl into the tubes for CSF and PFP .
	Take 25 µl of the acylated standards, controls and samples for the Serotonin RIA

2.2 Serotonin RIA

1.	Pipette 25 µl of prepared Standard A into the tubes for the NSB .
2.	Pipette 25 µl of prepared standards, controls and samples into the respective tubes .
3.	Pipette 50 µl of the ¹²⁵I Serotonin into all tubes .
4.	Pipette 50 µl of Serotonin Antiserum into all tubes (except totals and NSB) ; mix thoroughly.
5.	Cover tubes. Incubate for 90 min at 2 - 8 °C .
6.	Mix the chilled (2 - 8 °C) Precipitating Reagent thoroughly, pipette each 500 µl into all tubes (except totals) , and mix on a vortex.
7.	Incubate for 15 min at 2 - 8 °C .
8.	Centrifuge for 15 min at 3,000 x g , if possible in a refrigerated centrifuge.
9.	Decant or aspirate the supernatant carefully (except totals) . Blot the tubes dry and leave them upside down for 2 minutes.
10.	Count all tubes for 1 minute in a gamma counter.

3. Calculation of results

Measuring range for CSF and PFP samples	Serotonin
	0.75 – 125 ng/ml

Subtract the mean cpm of the non-specific binding NSB from the mean cpm of standards, controls and samples.

The standard curve from which the concentrations in the samples can be read off, is obtained by plotting the percentage of (B-NSB)/ (B₀-NSB) measured for the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis).

Use a non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).

⚠ *This assay is a competitive assay. This means: the counts are decreasing with increasing concentrations of the analyte. Counts found below the standard curve correspond to high concentrations of the analyte in the sample and have to be reported as being positive.*

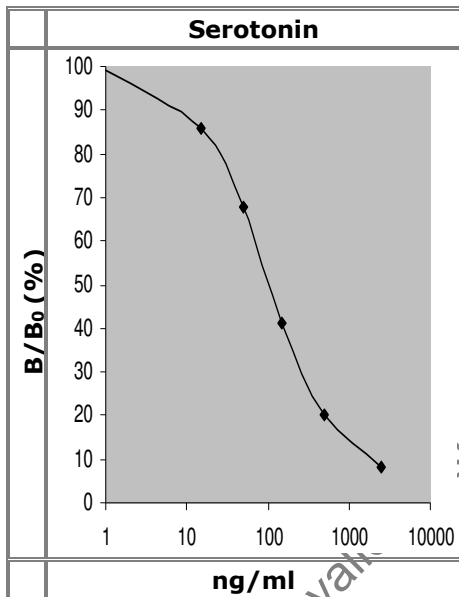
The read concentrations for the **platelet-free plasma and the cerebrospinal fluid** have to be **divided by 20**.

Conversion

Serotonin (ng/ml) x 5.67 = Serotonin (nmol/l)

Typical standard curve

⚠ *Example, do not use for calculation!*



Please use only the value of the Instructions for Use provided with the kit

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

¹²⁵I – Radioimmunoassay für die In-Vitro Diagnostik zur quantitativen Bestimmung von Serotonin in Serum, Urin und Thrombozyten.

Dieser Assay kann, im Falle von ausschließlich wissenschaftlicher Zweckbestimmung, auch für die Messung von Liquor (Cerebrospinale Flüssigkeit; CSF) und Thrombozytenfreiem Plasma (platelet-free plasma; PFP) verwendet werden. Bitte halten Sie sich hierbei an die Anleitung im Anhang I.

Während der Probenvorbereitung wird Serotonin zu seinem entsprechenden N-Acyl-Derivat acyliert. Die Testdurchführung folgt den Grundprinzipien eines Radioimmunoassays. Radioaktiv markiertes Antigen und nicht markiertes Antigen binden kompetitiv an eine definierte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Nach Gleichgewichtseinstellung werden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem zweiten Antikörper in Anwesenheit von PEG gefällt. Das Präzipitat wird nach Zentrifugieren und Dekantieren oder Absaugen des Überstands in einem Gamma-Counter gemessen. Die Menge an radioaktiv gebundenem Antigen ist indirekt proportional zur Antigenkonzentration der Probe.

Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve und Abgleich der gemessenen Aktivitäten ermittelt.

1.2 Klinische Anwendung

Serotonin (5-Hydroxytryptamin) ist ein Intermediärprodukt des Tryptophanstoffwechsels und ein gut untersuchter Neurotransmitter des zentralen Nervensystems. Serotonin kann in hohen Konzentrationen in den enterochromaffinen Zellen des Darms (EC-Zellen), den serotonergen Neuronen des Gehirns und den Thrombozyten nachgewiesen werden. Ungefähr 80% des gesamten Serotonins wird dabei in den EC-Zellen gebildet. Serotonin wird hauptsächlich zu 5-Hydroxyindol-Essigsäure (5-HIAA) abgebaut, welche danach über die Nieren ausgeschieden wird.

Im Blutkreislauf befindet sich der weitaus größte Teil des Serotonins in den Blutplättchen. Veränderte Serotoninspiegel spielen eine Rolle unter verschiedenen pathologischen Zuständen, einschließlich bei Migräne, Schizophrenie, der essentiellen Hypertonie, Huntington's Chorea, Duchenne's Muskeldystrophie und akuter Blinddarmentzündung nachweisbar.

Große klinische Bedeutung hat die Serotoninbestimmung im Serum für die diagnostische Abklärung des Karzinoidsyndroms. Eine zunehmende Bedeutung ist für die Bestimmung von Serotonin in Thrombozyten - einschließlich entsprechender Aufnahme- und Freisetzungskinetiken - zu erwarten.

Therapeutische Konsequenzen dürfen niemals allein auf Grund von Laborwerten herangezogen werden, auch wenn diese Werte in Übereinstimmung mit den Qualitätskriterien der Methode beurteilt werden. Jedes Laborergebnis trägt immer nur zu einem Teil des klinischen Bildes bei.

Nur wenn die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild stehen, dürfen daraus therapeutische Konsequenzen abgeleitet werden.

Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

- (1) Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter *Verwendungszweck* (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (4) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Alle Reagenzien des Kits, mit Ausnahme des **PREC-REAG**, sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (6) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.
- (7) Das radioaktive Material (¹²⁵Iod, Halbwertszeit 60 Tage, gibt eine ionisierende Röntgenstrahlung mit 28 keV und eine Gammastrahlung mit 35,5 keV ab) darf nur von Ärzten, Laboren oder Krankenhäusern in Empfang genommen, erworben, besessen und verwendet werden. Der Vertrieb des Produktes erfolgt unter Beachtung der strahlenschutzrechtlichen Bestimmungen.

- (8) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (9) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (10) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Röhrchen sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (11) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (12) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (13) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (14) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (15) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen, siehe das Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (16) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (17) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.
- (18) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

2.2 Grenzen des Tests

Jede unsachgemäße Behandlung der Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

2.2.1 Interferenzen

Serum/Plasma

Proben, die ein Präzipitat oder die Fibrinfäden enthalten können zu ungenauen Ergebnissen führen. Hämolytische Proben (bis zu 4 mg/ml Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 50 mg/dl Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 1600 mg/dl Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse.

Sammelurin

Probenvorbereitung beachten! Ist der Säuregehalt des 24 Stunden-Sammelurins zu hoch, führt dies zu falschen Ergebnissen der Urinproben.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des Serotonin-Gehaltes in der Probe beeinflusst.

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufzubewahren. Die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 1 Monat stabil, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden.

4. Materialien


4.1 Reagenzien im Kit

BA R-8910 SER-AS **Serotonin Antiserum** - Gebrauchsfertig


Inhalt: Kaninchen Anti-Serotonin Antikörper, blau gefärbt

Volumen: 1 x 5,25 ml/Fläschchen, Deckel blau

BA R-0920 ¹²⁵I-SER **¹²⁵I – Serotonin** - Gebrauchsfertig

Inhalt: ¹²⁵I markiertes Serotonin, rot gefärbt
 Volumen: 1 x 5,5 ml/ Fläschchen, Deckel orange
 Mögliche Gefahren:  Radioaktiv, Aktivität < 200 kBq

BA R-8912 ACYL-REAG **Acylation Reagent** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Azylierungsreagenz in Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid
 Volumen: 1 x 3 ml/ Fläschchen, Deckel grün
 Mögliche Gefahren: 

H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
 H360D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
 H312 + H332 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.
 H319 Verursacht schwere Augenreizung.

BA R-8911 ACYL-BUFF **Acylation Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: TRIS Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel
 Volumen: 1 x 30 ml/ Fläschchen, Deckel hellgrau

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration ng/ml	Konzentration nmol/l	Volumen/ Fläschchen
BA R-8901	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA R-8902	STANDARD B	hellgelb	15	85,1	4 ml
BA R-8903	STANDARD C	orange	50	284	4 ml
BA R-8904	STANDARD D	dunkelblau	150	851	4 ml
BA R-8905	STANDARD E	hellgrau	500	2835	4 ml
BA R-8906	STANDARD F	schwarz	2500	14175	4 ml
BA R-8951	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben		4 ml
BA R-8952	CONTROL 2	dunkelrot			4 ml

Umrechnung: Serotonin (ng/ml) x 5,67 = Serotonin (nmol/l)

Inhalt: TRIS Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel, aufgestockt mit einer definierten Menge Serotonin

BA R-0025 PREC-REAG **Precipitating Reagent**- Gebrauchsfertig

Inhalt: Ziege anti-Kaninchen Serum in PEG Phosphatpuffer
 Volumen: 1 x 55 ml/ Fläschchen, Deckel weiß

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber für die Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 25 – 2000 µl
- Plastik-Röhrchen (Polystyrol oder Polypropylen) mit passendem Ständer
- Zentrifuge (möglichst mit Kühlung), mind. 3000 x g
- Absaug- oder Dekantiervorrichtung
- Vortex-Mischer
- Gamma-Counter
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

5. Probenmaterial und Lagerung

Bis zu 2 Tage vor und am Tag der Probennahme (Sammelurin) dürfen keine serotoninhaltigen Nahrungsmittel oder deren Säfte verzehrt werden. Hierzu gehören Ananas, Auberginen, Avocados, Bananen, Johannisbeeren, Kiwis, Melonen, Mirabellen, Pfirsiche, Schokolade, Stachelbeeren, Tomaten, Walnüsse und Zwetschgen. Selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer beeinflussen den Serotoninspiegel. Patienten, die solche Medikamente einnehmen, sollen vor einer Probennahme Rücksprache mit ihrem behandelnden Arzt halten.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte generell vermieden werden.

Serum

Blut durch Venenpunktion entnehmen (mit Monovette™ oder Vacuette™ für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation (nach Angabe des Herstellers) abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien einnehmen, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Hämolytische, ikterische und lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: bis zu 24 Stunden bei 2 - 8 °C; für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Urin

Es kann Spontanurin oder 24 Stunden Sammelurin verwendet werden (im Sammelbehälter werden zur Stabilisierung des Sammelurins 10 - 15 ml 6 M HCl vorgelegt).

Für die quantitative Bestimmung der im Verlauf eines Tages ausgeschiedenen Mengen an Serotonin ist es notwendig, das Volumen des Tagesurins zu bestimmen und für die spätere Auswertung der Ergebnisse zu notieren.

Lagerung: für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C. Direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden.

Thrombozyten

Mehr als 98 Prozent des zirkulierenden Serotonins ist in Thrombozyten zu finden und wird während der Blutgerinnung ausgeschüttet. Das durch Venenpunktion entnommene Vollblut in einem für EDTA- oder Citrat-Plasma vorgesehenen Blutentnahmeröhrchen (Monovette™ oder Vacuette™) sammeln.

Um thrombozytenreiches Plasma (PRP) zu erhalten, müssen die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert werden (200 x g). Den Überstand in ein weiteres Röhrchen überführen und die Thrombozyten auszählen.

Ein Thrombozyten - Pellet erhält man, wenn 800 µl physiologische Kochsalzlösung zu 200 µl PRP (enthält zwischen 350.000 - 500.000 Thrombozyten/µl) hinzu gegeben und anschließend zentrifugiert wird (4500 x g, 10 Minuten bei 4 °C). Den Überstand danach dekantieren.

200 µl Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) werden zum Pellet hinzugefügt und sorgfältig auf einem Vortex-Mischer gemischt. Die Suspension kann gefroren mehrere Wochen bei - 20 °C gelagert werden.


Die Proben nach dem Auftauen kurz bei 10000 x g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren.

25 µl des Überstandes werden für die Probenvorbereitung (Azylierung) benötigt.


6. Testdurchführung

Dieser Assay kann, im Falle von ausschließlich wissenschaftlicher Zweckbestimmung, auch für die Messung von Liquor (Cerebrospinale Flüssigkeit; CSF) und Thrombozytenfreiem Plasma (platelet-free plasma; PFP) verwendet werden. Bitte halten Sie sich hierbei an die Anleitung im Anhang I.

Alle Reagenzien und Proben, mit Ausnahme des **PREC-REAG**, müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Die verwendeten Röhrchen (**Polystyrol oder Polypropylen**) eindeutig nummerieren. Es empfiehlt sich, Doppelbestimmungen anzusetzen.

 *Es ist erforderlich, die Röhrchen 1 Min bei 500xg zu zentrifugiert, falls sich nach den jeweiligen Pipettierschritten Flüssigkeitsreste am Röhrchenrand befinden sollten. Es dürfen keine Glasröhrchen für den Test verwendet werden!*

6.1 Vorbereitung und Azylierung für Serum, Urin und Thrombozyten

1. Jeweils 25 µl Standards, Kontrollen und Serum-, Urin- und Thrombozyten-Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
2. 250 µl ACYL-BUFF in alle Röhrchen pipettieren.
3. 25 µl ACYL-REAG in alle Röhrchen pipettieren.
4. Sorgfältig mischen und 30 Min bei RT (20-25°C) inkubieren.
5. Je 2 ml Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in alle Röhrchen pipettieren und sorgfältig mischen (Vortex).
 Je 25 µl der azylierten Standards, Kontrollen und Proben werden für den nachfolgenden Serotonin RIA benötigt.

6.2 Serotonin RIA

1.	Jeweils 25 µl des acylierten Standard A in die Röhrchen für die NSB pipettieren.
2.	Jeweils 25 µl der acylierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
3.	Je 50 µl ¹²⁵I-SER in alle Röhrchen pipettieren.
4.	Je 50 µl AS SER in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T und NSB) pipettieren und sorgfältig mischen (Vortex).
5.	Röhrchen abdecken und 90 Minuten bei 2 – 8 °C inkubieren.
6.	Das vorgekühlte (2 - 8 °C) PREC-REAG gründlich aufschütteln und jeweils 500 µl in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T) pipettieren und sorgfältig mischen (Vortex).
7.	15 Min bei 2 - 8 °C inkubieren.
8.	15 Min bei 3000 x g , möglichst mit Kühlung, zentrifugieren .
9.	Überstand dekantieren oder vorsichtig absaugen (außer Totalaktivität T). Röhrchen ausklopfen und für 2 Minuten umgedreht stehen lassen.
10.	Röhrchen 1 Minute in einem Gamma-Counter messen .

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Serotonin
	6,7 - 2500 ng/ml

Der Mittelwert der cpm der Nicht-Spezifischen-Bindung NSB wird von den Mittelwerten der Standards, Kontrollen und Proben abgezogen.

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntesten Proben ermittelt werden kann, wird nach Auftragen der (B-NSB)/(B₀-NSB) für die Standards im linearen Maßstab auf der y-Achse gegen die entsprechende Konzentration im logarithmischen Maßstab auf der x-Achse erstellt.

Zur Kurvenberechnung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) verwendet.

 *Dieser Assay ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die Counts mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. Counts die unterhalb der Counts der Standardkurve liegen, entsprechen einer sehr hohen Konzentration des Analyten in der gemessenen Probe und müssen als positiv gewertet werden.*

Die Konzentrationen der **Serum-, Urin- und Thrombozyten-Proben sowie der Kontrollen** können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Berechnung des Serotoningehalts in Thrombozyten

Am nachfolgenden Beispiel soll die Berechnung veranschaulicht werden:

Der Serotoningehalt in Blutplättchen wird generell auf 10⁹ Blutplättchen bezogen. Aus der Standardkurve wird z. B. ein Wert von 100 ng/ml abgelesen. Die Auszählung der Blutplättchen ergibt einen Wert von 300.000 Zellen/µl. Dies würde 0,3 x 10⁹ Blutplättchen/ml entsprechen mit einem Serotoningehalt von 100 ng. Damit würde sich ein Serotoningehalt in den Blutplättchen von 333 ng/10⁹ Zellen ergeben (100 ng x 1,0 x 10⁹ / 0,3 x 10⁹).

Umrechnung

Serotonin (ng/ml) x 5,67 = Serotonin (nmol/l)

Erwartete Referenzwerte


Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

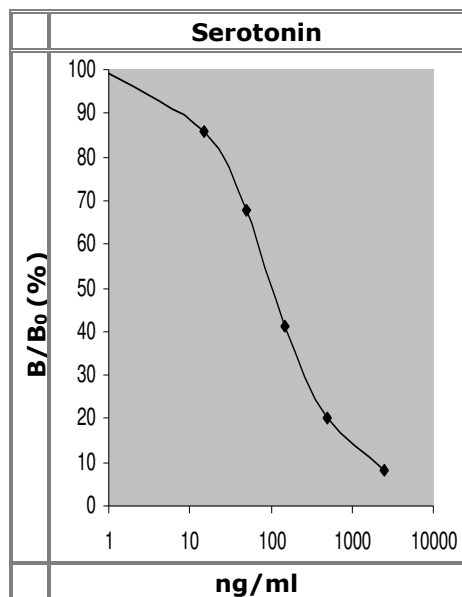
	Serotonin
Serum	70 - 270 ng/ml
Sammelurin	50 - 250 µg/24h
Serotonin in Thrombozyten	500 - 950 ng/10 ⁹ Blutplättchen

7.1 Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie entweder die Kitkontrollen und/oder andere kommerzielle Kontrollproben im normalen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Diese Kontrollen müssen dabei wie die unbekanntesten Proben behandelt werden. Die Kontrollproben müssen dabei innerhalb der Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

7.2 Typische Standardkurve

 Beispiel, bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8. Testcharakteristika

Analytische Sensitivität	Limit of Detection (LOD)	6,6 ng/ml
	Limit of Quantitation (LOQ)	10,5 ng/ml

Analytische Spezifität (Kreuzreaktion)	Substanz	Kreuzreaktion (%)
		Serotonin
	Tryptamin	3,64
	Melatonin	0,06
	5-Hydroxyindol-Essigsäure	<0,01
	5-Hydroxy-2- Carbonsäure	<0,01
	Phenylalanin	<0,01
	Histidin	<0,01
	Tyramin	<0,01
	5-Hydroxytryptophan	<0,01
	Tyrosin	<0,01

Präzision							
Intra-Assay				Inter-Assay			
	Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)		Probe	Bereich (ng/ml)	CV (%)
Urin	1	106 ± 12,4	11,7	Urin	1	128 ± 16,3	12,8
	2	401 ± 44,0	11,0		2	174 ± 15,8	9,1
	3	1373 ± 100	7,3		3	358 ± 26,1	7,3
Serum	1	253 ± 10,5	4,2	Serum	1	86,7 ± 5,9	6,8
	2	164 ± 9,7	5,9		2	144 ± 11,4	7,9
					3	363 ± 21,5	5,9

Linearität			Bereich	Serielle Verdünnung bis:	Bereich (%)
	Serotonin	Urin	55 - 1029 ng/ml	1:21	89 - 116
		Serum	48 - 981 ng/ml	1:21	81 - 102

Wiederfindung			Mittelwert (%)	Bereich (%)	% Wiederfindung nach Aufstockung
	Serotonin	Urin	88	83 - 94	
		Serum	98	90 - 107	







Methodenvergleich mit ELISA* * ELISA Immunotech	Urin	ELISA = 1,49 RIA - 44,03	R ² = 0,99; n = 19
	Serum	ELISA = 1,25 RIA - 20,09	R ² = 0,99; n = 20

9. Referenzen/Literatur

- (1) Peng et al. Role of 5-hydroxytryptamine expression in cerebellar Purkinje cells in obstructive sleep apnea syndrome. Neural Regeneration Research, 7(8):606-610 (2012)
- (2) Wozniak et al. Serotonin and Neuron-specific Enolase: Serum Acute Mid-term Levels and their Association With Posttraumatic Depression. Neurosurgery Quarterly, 20(4):297-303 (2010)
- (3) Tan et al. Circadian rhythm of salivary serotonin in patients with major depressive disorder Neuroendocrinology Letters 28(4):101-106 (2007)

△ Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anforderung von Ihrem Anbieter gerne zu Verfügung gestellt.

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer		

Protokoll für die quantitative Bestimmung von Serotonin in **Liquor (Cerebrospinale Flüssigkeit; CSF) und thrombozytenfreiem Plasma (platelet-free plasma; PFP)**

1. Probenmaterial und Lagerung

Thrombozytenfreies Plasma (platelet-free plasma; PFP)

Um zunächst thrombozytenreiches Plasma (PRP) zu erhalten, müssen die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert werden (200 x g). Anschließend den Überstand (PRP) in ein weiteres Röhrchen überführen. Um Serotonin in **thrombozytenfreiem Plasma (PFP)** messen zu können, wird ein Aliquot des Überstandes (**PRP**) bei 4500 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert.


Auf diese Weise gewonnenes thrombozytenfreies Plasma (PFP) kann bei - 20 °C bis zu 2 Wochen gelagert werden.

Liquor (Cerebrospinale Flüssigkeit; CSF)


Lagerung: bei - 20 °C.

2. Testdurchführung

Alle Reagenzien und Proben, mit Ausnahme des **PREC-REAG**, müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Die verwendeten Röhrchen (**Polystyrol oder Polypropylen**) eindeutig nummerieren. Es empfiehlt sich, Doppelbestimmungen anzusetzen.

 *Es ist erforderlich, die Röhrchen 1 Min bei 500 x g zu zentrifugiert, falls sich nach den jeweiligen Pipettierschritten Flüssigkeitsreste am Röhrchenrand befinden sollten. Es dürfen keine Glasröhrchen für den Test verwendet werden!*

2.1 Vorbereitung und Azylierung

1.	Jeweils 25 µl Standards und Kontrollen und 100 µl vom Liquor (CSF) und thrombozytenfreiem Plasma (PFP) in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
2.	250 µl ACYL-BUFF zu den Röhrchen mit Standards und Kontrollen und 50 µl in die Röhrchen mit CSF und PFP pipettieren.
3.	25 µl ACYL-REAG zu den Röhrchen mit Standards und Kontrollen und 5 µl in die Röhrchen mit CSF und PFP pipettieren.
4.	Sorgfältig mischen und 30 Min bei RT (20 - 25 °C) inkubieren.
5.	Je 2 ml Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) in die Röhrchen mit Standards und Kontrollen und 300 µl in die Röhrchen mit CSF und PFP pipettieren.
	Jeweils 25 µL der acylierten Standards, Kontrollen und Proben werden für den Serotonin RIA benötigt.

2.2 Serotonin RIA

1.	Jeweils 25 µl des acylierten Standard A in die Röhrchen für die NSB pipettieren.
2.	Jeweils 25 µl der acylierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
3.	Je 50 µl ¹²⁵I-SER in alle Röhrchen pipettieren.
4.	Je 50 µl AS SER in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T und NSB) pipettieren und sorgfältig mischen (Vortex).
5.	Röhrchen abdecken und 90 Minuten bei 2 - 8 °C inkubieren.
6.	Das vorgekühlte (2 - 8 °C) PREC-REAG gründlich aufschütteln und jeweils 500 µl in alle Röhrchen (außer Totalaktivität T) pipettieren und sorgfältig mischen (Vortex).
7.	15 Min bei 2 - 8 °C inkubieren.
8.	15 Min bei 3000 x g , möglichst mit Kühlung, zentrifugieren .
9.	Überstand dekantieren oder vorsichtig absaugen (außer Totalaktivität T). Röhrchen ausklopfen und für 2 Minuten umgedreht stehen lassen.
10.	Röhrchen 1 Minute in einem Gamma-Counter messen .


3. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich für CSF und PFP Proben	Serotonin
	0,75 – 125 ng/ml

Der Mittelwert der cpm der Nicht-Spezifischen-Bindung NSB wird von den Mittelwerten der Standards, Kontrollen und Proben abgezogen.

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannt Proben ermittelt werden kann, wird nach Auftragen der (B-NSB)/(B0-NSB) für die Standards im linearen Maßstab auf der y-Achse gegen die entsprechende Konzentration im logarithmischen Maßstab auf der x-Achse erstellt.

Zur Kurvenberechnung wird eine nicht-lineare Regression (z. B.: spline, 4- parameter, akima) verwendet.


 *Dieser Assay ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die Counts mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. Counts die unterhalb der Counts der Standardkurve liegen, entsprechen einer sehr hohen Konzentration des Analyten in der gemessenen Probe und müssen als positiv gewertet werden.*

Die aus der Standardkurve abgelesenen Konzentrationen des **thrombozytenfreien Plasmas** und des **Liquors** müssen durch **20 dividiert** werden.

Umrechnung

Serotonin (ng/ml) x 5,67 = Serotonin (nmol/l)

Typische Standardkurve

 *Beispiel, bitte nicht für die Auswertung verwenden!*

