Українська

Інструкція з використання

Серотонін

Імуноферментний аналіз для in vitro діагностики кількісного визначення серотоніну в сироватці крові людини, плазмі, тромбоцитах та сечі. Також тест може бути використаний для дослідження гомогенатів тканин і супернатантів клітинних культур.

REF **RE 59121**

Σ **96**

2-8°C

EU: IVD CE

I B L I N T E R N A T I O N A L G M B H

Flughafenstrasse 52a **Телефон: +49 (0)40-53 28 91-0** **IBL@IBL-International.com**
D-22335 Гамбург, Німеччина **Факс: +49 (0)40-53 28 91-11** **www.IBL-International.com**

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

1. ПРИЗНАЧЕНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз для діагностичного кількісного визначення серотоніну в сироватці крові людини, плазмі, тромбоцитах, сечі. Далі тест може бути використаний для дослідження гомогенатів тканин та супернатантів клітинної культури.

2. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ І ПОЯСНЕННЯ

Серотонін є проміжним продуктом метаболізму триптофану і розташований переважно в ентерохромофінових клітинах кишечника, серотонінергічних нейронах мозку, тромбоцитах крові і загальноприйнятний як нейротрансмітер в центральної нервовій системі.

Майже весь серотонін у циркулюючої 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 початковий гострий апендицит. Визначення рівня сироваткового серотоніну має велике клінічне значення для діагностики оцінки карциноїдного синдрому. Зростає інтерес до визначення серотоніну в тромбоцитах ,в тому числі кінетика поглинання та вивільнення очікується в найближчому майбутньому.

3. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Підготовка зразка (дериватизація серотоніну до N- ацилсеротоніну) є частиною розведення зразка і досягається інкубацією відповідного зразка з реагентом для ацилювання.

Процедура аналізу дотримується основного принципу конкурентного , згідно з якою існує конкуренція між біотинільованим та небіотинільованим антигеном для фіксованого числа сайтів, що зв'язують антитіла. Кількість біотинильованого антигену, зв'язаного з антитілом, обернено пропорційна концентрації аналіту в зразку.

Коли система знаходиться у рівновазі, вільний біотинільований антиген видаляється стадією промивання і пов'язаний з антитілом біотинільований антиген визначається використанням стрептавідину лужної фосфатази як маркера і п- нітрофенілфосфату як субстрату. Кількісне визначення невідомих досягається шляхом порівняння ферментативної активності невідомих з кривою відповідності, підготовленою за допомогою відомих стандартів.

4. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

1. Тільки для діагностики in-vitro , тільки для професійного використання.
2. Перед початком аналізу уважно прочитайте інструкції. Використовуйте дійсну версію інструкції, вкладену в пакет набору. Будьте впевнені, що все зрозуміло.
3. У випадку серйозного пошкодження пакету набора звертайтесь до IBL або вашого постачальника у письмовій формі, не пізніше ніж через тиждень після отримання набору. Не використовуйте компоненти, пошкоджені під час тестування, але зберігання їх безпечне для вирішення питань, пов'язаних зі скаргою.
4. Перевірте номер та дату закінчення терміну придатності. Не змішувати реактиви різних партій. Не використовуйте реагенти поза терміном придатності.
5. Дотримуйтесь належної лабораторної практики та правил техніки безпеки. Носити латексні рукавички, одноразові латексні рукавички та захисні окуляри, де це необхідно.
6. Реагенти цього комплекту, що містять шкідливий матеріал, можуть спричинити подразнення очей та шкіри. Дивіться МАТЕРІАЛИ НАДАНІ та мітки для деталей. Паспорти безпеки матеріалів для цього продукту доступні на IBLHomepage або за запитом безпосередньо від IBL.
7. Хімікати та підготовлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи відповідно до національного законодавства щодо біологічної небезпеки та правил техніки безпеки.
8. Персонал прибиральників повинен керуватися фаховими пам’ятками щодо потенційних небезпек і поводження.
9. Уникайте контакту з Стоп розчином. Це може викликати подразнення шкіри та опіки.

5. ЗБЕРІГАННЯ І СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір постачається при температурі навколишнього середовища та зберігається при 2-8 ° C. Тримайте подалі від нагрівання або прямого сонячного світла. Зберігання та стійкість зразків та підготовлених реагентів вказано у відповідних главах.

Стріпи мікропланшета стабільні до зазначеного терміну придатності після розбиття набору. Переконайтеся, що розкритий пакет щільно закритий і зберігається при 2-8 ° C.

6. ЗАБІР ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Деякі харчові продукти містять значну кількість серотоніну. Крім того, деякі ліки можуть спричинити виділення серотоніну і можуть призвести до зміненого рівня серотоніну. Пацієнтам слід утриматися від такої їжі, багатої серотоніном, як (наприклад, авокадо, банани, кава, сливи, ананас, помідори, волоські горіхи), також як і від деяких препаратів (наприклад, аспірин, кортикотропін, інгібітори МАО, фенацетин , катехоламіни,резерпін, нікотин).

Сироватка

Звичайних запобіжних заходів для венепункції слід дотримуватись. Важливо зберегти хімічну цілісність зразка крові від моменту її збирання до моменту аналізу. Не використовувати сильно гемолітичних, жовтяничних або грубо ліпемічних зразків. Зразки, що з'являються мутними, повинні бути центрифуговані перед нанесенням для видалення будь-якого твердого матеріалу.

зберігання	18-25 °C	2-8 °C	≤ -20°C (аліквоти)	Тримайте подалі від нагрівання або прямого сонячного проміння. Уникайте повторних циклів заморожування-розморожування. Транспортувати зразки замороженими.
стабільність	2 години	6 годин	3 місяці	

Сеча

Можливо використовувати спонтанну, а також 24 годинну сечу. Загальний об'єм сечі, що виділяється протягом 24 хв, слід збирати та змішувати в одній пляшці, що містить 10-15 мл 6 N HCl як консервант. Визначте загальний об'єм для розрахунку результатів. **Змішати та центрифугувати зразки перед використанням у дослідженні.**

Зберігання	≤ -20°C (аліквоти)	Тримайте подалі від нагрівання або прямого сонячного проміння. Уникайте повторних циклів заморожування-розморожування.
Стабільність	6 місяців	

Плазма, тромбоцити

Більше 98 відсотків циркулюючого серотоніну локалізовано в тромбоцитах і виділяється при звертанні крові. Кров за допомогою венепункції слід збирати в пластикові пробірки, що містять EDTA або цитрат як антикоагулянт (наприклад, 10 мл Monovette NC з 1 мл розчину цитрату з SARSTEDT). Зразки зберігають та центрифугують при кімнатній температурі протягом 10 хв при 200 x g для отримання плазми, багатої тромбоцитами ПБТ). ПБТ - супернатант потім переноситься в іншу пробірку і підраховуються тромбоцити.
Для отримання гранул тромбоцитів аліквот 200мкл ПБТ (що містить від 350000 до 500000 тромбоцитів / мкл) додати до 800 мкл фізіологічного розчину і центрифугувати при 4500 x g протягом 10 хв при 4 ° C (або при 10000 x g протягом 2 хв при 4 ° C). Після цього супернатант видаляють.
До гранули додають 200 мкл двічі дистильованої води, яку потім можна зберігати у замороженому вигляді при температурі <-20 ° C протягом кількох тижнів без будь-яких змін вмісту серотоніну. Після відтавання заморожені зразки центрифугують при 10 000 x g протягом 2 хв при кімнатній температурі. При проведенні застосовують 20 мкл супернатанту (див. Ацилювання).
Якщо ви хочете виміряти серотонін у плазмі крові , вільної від тромбоцитів (ПВТ), аліквоту ПБТ центрифугують при 4500 x g протягом 10 хв при 4 ° C (або при 10 000 x g протягом 2 хв при 4 ° C), щоб отримати плазму , вільну від тромбоцитів (ПВТ). 50 мкл супернатанту використовують в для вимірювання вільного (не зв'язаного з тромбоцитами) серотоніну (див. Ацилювання).
ПРИМІТКА: Пряме визначення серотоніну в ПБТ показало, що приблизно в 10% зразків ПБТ непередбачувані високі концентрації серотоніну були виміряні (результати, отримані за допомогою HPLC та флюорометрії). Щоб уникнути таких розбіжностей, було рекомендовано окреме вимірювання серотоніну в тромбоцитах та плазмі, вільній від тромбоцитів.

	ПВТ	*Тромбоцити (після відділення з плазми)*		Тримайте подалі від нагрівання або прямого сонячного світла. Уникайте повторного заморожування-розморожування циклів. Транспортувати зразки замороженими.
зберігання	≤ -20°C (аліквоти)	≤ -20°C (аліквоти)	≤ -80°C (аліквоти)	
стабільність	2 тижні	4 тижні	12 місяців	

Тканинні гомогенати , супернатанти клітинної культури

Центрифуговані тканинні гомогенати та супернатант клітинних культур можуть використовуватися без спеціальних запобіжних заходів.

Увага: культура клітинного середовища може містити серотонін!

зберігання	≤ -20°C (аліквоти)	Тримайте подалі від нагрівання або прямого сонячного світла. Уникайте повторного заморожування-розморожування циклів.
стабільність	6 місяців	

7. МАТЕРІАЛИ надані

Реагенти, забезпечені цим набором, є достатніми для одноразових визначень при підготовці зразка (ацилюванні) та дублікатів в аналізі. Додаткові реагенти доступні за запитом.

кількість	**символ**	**компонент**
1x12x8	MTP	Мікропланшет, розбірні стріпи Покритий антикролячею антисироваткою (козячею)
1x8мл	**ANTISERUM**	Серотонін Антисироватка Синій колір. Готова до використання. Містить: антисироватка (кролик), фосфатний буфер,<0,1% NaN3
1x8мл	**BIOTIN**	Серотонін Біотин Жовтий колір. Готовий до використання. Містить: <0,1% NaN3
1x0,3мл	**ENZCONJ CONC**	Кон'югат ферменту, концентрат (100x) Містить: стрептавідин лужну фосфатазу, трис буфер, HCl, <0,1% NaN3.
1x7x1мл	**CAL A-G**	**Стандарт A-G** 0; 0,08; 0,24; 0,73; 2.2; 6.6; 19,8 нг / мл 0; 0,45; 1.4; 4.1; 12,5; 37,4; 112,3 нмоль / л Готовий до використання. Містить: серотонін (ацильований), фосфатний буфер, <0,1% NaN3.
1x2x0,5мл	**CONTROL 1+2 LYO**	Контроль 1 + 2, ліофілізований Містить: людську сироватку, <0,1% NaN3. Концентрація / прийнятні діапазони - сертифікат QC
1x3мл	**ACYLREAG**	Реагент для ацюлювання Ангідрид оцтової кислоти, ацетон. Готовий до використання.
1x50мл	**ASSAYBUF CONC**	Буфер аналізу концентрат (10x) Містить: фосфатний буфер, BSA, <1% NaN3.
2x50мл	**WASHBUF CONC**	Промивний буфер концентрат (20x) Містить: фосфатний буфер, Твін, <0,1% тимеросалу
1x13мл	**PNPP SUBS**	ПНФФ розчин субстрату Готовий до використання. Містить: п-нітрофенілфосфат (ПНФФ).
1x15мл	**PNPP STOP**	ПНФФ стоп розчин Готовий до використання Містить: 1 M NaOH
3x	**FOIL**	клейова фольга

8. МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ НАДАНІ

1. Мікропіпетки (Multipette Eppendorf або аналогічні пристрої, <3% CV). Об'єм: 20; 25; 50; 100; 1000 мкл
2. Пробірки скляні одноразові (12 x 75 мм)
3. Штатив для пробірки
4. Орбітальний шейкер (500 об / хв)
5. Змішувач вихровий
6. Водяна баня, 37 ° C
7. 8-канальна мікропіпетка з резервуарами реагентів
8. Промивна пляшка, автоматична або напівавтоматична система миття мікропланшетів
9. Центрифуга; ≥1500 x g
10. Рідер мікропланшетів, здатний читати абсорбцію при 405 нм (референтна довжина хвилі 600-650 нм)
11. Бідистильована або або дейонізована вода
12. Паперові рушники, наконечники піпетки та таймер

9. ПРОЦЕДУРА ПРИМІТКИ

1. Будь-яка неналежна обробка зразків або модифікація процедури випробувань може вплинути на результати. Вказані обсяги піпетування, періоди інкубації, температура та етапи попередньої обробки повинні виконуватися суворо відповідно до інструкцій. Використовуйте лише калібровані піпетки та прилади.
2. Як тільки тест буде розпочато, всі кроки повинні бути завершені без перерви. Переконайтеся, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої готові в належний час. Дозвольте всім реагентам та зразкам досягати кімнатної температури (18-25 ° C) і обережно прокрутити кожен флакон рідкого реагенту та зразку перед використанням. Змішувати реагенти без піноутворення.
3.Уникайте забруднення реагентів, піпеток та лунок / пробірок. Використовуйте нові одноразові наконечники для піпетки для кожного компонента та зразка. Не обмінюйте ковпачки. Завжди закривайте флакони, що не використовуються. Не використовувати повторно лунки / пробірки або реагенти.
4. Деякі компоненти містять ≤ 250 мкл розчину. Перед тим, як відкрити, будьте обережними, щоб розчин був повністю на дні флакона.
5. Рекомендується визначати зразки в двох примірниках, щоб мати змогу виявити потенційні помилки піпетування.
6. Використовуйте схему піпетування, щоб перевірити відповідний макет пластини.
7. Час інкубації впливає на результати. Всі лунки повинні оброблятися в однаковій послідовності , порядку та часу. Рекомендується використовувати 8-канальну мікропіпетку для піпетування розчинів у всіх лунках.
8. Промивання планшета є важливим . Неправильно промиті лунки дадуть помилкові результати. Рекомендується використовувати багатоканальну піпетку або автоматичну систему миття мікропланшетів. Не дозволяйте лункам висихати між інкубаціями. Не подряпайте покриті лунки під час промивання та аспірації. Змийте та заповніть всі реагенти з обережністю. Під час промивання перевірте, чи всі лунки заповнені точно з промивним буфером, і що в лунках немає залишків.
9. Вологість впливає на покриті лунки/пробірки. Не відкривайте пакет, поки він не досягне кімнатної температури. Невикористані лунки / пробірки повинні бути негайно повернені до закритого пакету, включаючи осушувач.
10.Відносна відцентрова сила (g) не еквівалентна обертам на хвилину (об / хв), але вона повинна бути розрахована залежно від радіусу центрифуги.

10. ІНСТРУКЦІЇ ПО ПЕРЕДУСТАНОВОМУ НАЛАШТУВАННЮ

Для ручної та автоматичної версії.

Зміст набору для 96 визначень можна розділити на 3 окремі прогони. Обсяг, зазначений нижче, для одного пробігу складається з 4 стріпів (32 визначення).

Якщо замовник хоче зменшити кількість стандартів від 7 до 6 він може пропустити Стандарт G. Звітний діапазон потім буде зменшуватися до 155 мкг / л (плазма) або 706 мкг / л (сироватка, сеча, гомогенати тканин, супернатанти клітинних культур). Процедуру тестування можна виконати у короткій версії з інкубацією 3,5 год для сироватки, сечі, тромбоцитів, гомогенату тканин і супернатанту клітинної культури, но не для плазми або, в іншому варіанті з інкубацією протягом ночі для тих самих зразків і плазми. ПЛАЗМА ПОВИННА бути інкубована протягом ночі.

10.1. Підготовка ліофілізованих або концентрованих компонентів.

Розчинити/розвести	**Компонент**		**розчинник**	**співвідношення**	**примітки**	**зберігання**	**стабільність**
15 мл	ASSAYBUF CONC	Додати 150 мл	Бідистильована вода	1:10	жовто-коричневий колір може виникнути без впливу на результати досліджень	2-8°C	2 тижні
15 мл	WASHBUF CONC	Додати 300 мл	Бідистильована вода	1:20		2-8°C	4 тижні
	CONTROL 1+2 LYO	з 0,50 л	Бідистильована вода		Залишити постояти на 15 хв. Змішати без спінювання	≤ -20°C (аліквоти)	до терміну придатності
60 мкл	ENZCONJ CONC	з 6,0 мл	Розведений буфер аналізу	1:101	Підготувати свіжий і використовувати тільки один раз.	18-25°C	2 години

10,2. Розведення зразків
Зразки, що підозрюються, що містять концентрації, що перевищують найвищий стандарт, повинні бути розбавлені з буфером аналізу.

10.3. Ацилювання зразків та контролів (не стандартів).
Наступна процедура повинна виконуватися у двох варіантах:
Зразок А: сироватка, сеча, екстракт тромбоцитів, гомогенат тканин та контролі.
Зразок В: вільна від тромбоцитів плазма (що не містить тромбоцитів).
Не ацилювати стандарти. Вони вже ацильовані!
Підготовка зразка призводить до 107-кратного розбавлення сироватки, сечі, тромбоцитів, тканинних гомогенатів, супернатантів клітинної культури та контрольних речовин і до 23,5-кратного розбавлення зразків плазми. Це потрібно враховувати для розрахунку результатів.

10.3.1. Зразок А: сироватка, сеча, екстракт тромбоцитів, гомогенат тканин та контролі
1. Прокапайте 20 мкл кожного Контролю та зразок А в скляні пробірки.
2. Прокапайте 100 мкл розбавленого буферу для аналізу до кожної пробірки. Змішати (прокрутити)
3. Прокапайте 25 мкл реагенту для ацилювання в кожну пробірку. Змішати (прокрутити) кожну пробірку негайно після піпетування.
4. Накрити пробірки. Інкубувати 15 хвилин при 37 ° С у водяній бані.
5.Прокапайте 2 мл розбавленого буфера аналізу в кожну пробірку. Змішати (прокрутити).
6. Центрифугувати всі пробірки протягом 10 хв при 1500 x g.
Приготовані зразки повинні бути проаналізовані негайно.
Супернатант стабільний лише 1 годину при 18-25 ° С.

10.3.2. Зразок В: плазма, вільна від тромбоцитів
1. Прокапайте 50 мкл кожного зразка В в скляні пробірки.
2. Прокапайте 100 мкл розбавленого буферу для аналізу до кожної пробірки. Змішайте (прокрутити). (прокрутити).

3.Прокапайте 25 мкл реагенту для ацилювання в кожну пробірку. Змішайте (прокрутити) кожну пробірку негайно після піпетування.
4. Покрити пробірки. Інкубувати 15 хвилин при 37 ° C у водяній бані.
5. Прокапати 1 мл розбавленого буфера аналізу в кожну пробірку. Змішати (прокрутити).
6. Центрифугувати всі пробірки протягом 10 хв при 1500 x g.
Приготовані зразки повинні бути проаналізовані негайно.
Супернатант стабільний лише 1 годину при 18-25 ° C.

11. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ
11. 1 Коротка версія (Примітка: тільки для зразків А, але не для плазми)
1. Прокапайте 50 мкл кожного стандарту, ацильований контроль та ацильований зразок у відповідні лунки мікропланшету.
2.Прокапайте 50 мкл серотоніну біотину в кожну лунку.
3. Прокапайте 50мкл серотоніну анти сироватки в кожну лунку.
4. Покрийте мікропланшет з клейкою фольгою. Інкубуйте 90 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (500 об / хв) .
5. Видаліть клейку фольгу. Видалити інкубаційний розчин. Промивайте планшет 3 х з 250мкл розбавленого промивного буфера. Видаліть надлишковий розчин, торкнувшись перевернутою пластиною на паперового рушника.
6. Прокапайте 150мкл свіжоприготованого ферментного кон'югату в кожну лунку.
7. Покрийте мікропланшет з клейкою фольгою . Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (500 об / хв) .
8. Видаліть клейку фольгу. Видалити інкубаційний розчин. Промивайте планшет 3 х з 250мкл розбавленого промивного буфера. Видалити надлишок розчину, натиснувши перевернутою пластиною на паперовий рушник.
9. Для додавання субстрату та стоп-розчину використовуйте, якщо доступна, 8-канальну мікропіпетку. Піпетування слід проводити в ті ж часові інтервали для субстрату та стоп розчину. Використовуйте позитивне заміщення та уникайте утворення повітряних бульбашок.
10. Піпетуйте 200 мкл розчину субстрату ПНФФ у кожну лунку.
11. Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (500 об / хв) .
12. Зупиніть реакцію субстрату, додаючи до кожної лунки 50 мкл ПНФФ стоп розчину. Коротко змішуйте вміст, обережно струшуючи пластину.
13. Виміряти оптичну густину фотометром при 405 нм (референтна довжина хвилі 600-650 нм) протягом 60 хвилин після піпетування стоп-розчину).

11.2. Альтернативна версія з інкубацією протягом ночі (Зразки А та В)
11.2.1. Перший день
1. Прокапайте 50 мкл кожного стандарту, ацильований контроль та ацильований зразок у відповідні лунки мікропланшету.
2. Прокапайте 50мкл серотоніну біотину в кожну лунку.
3. Прокапайте 50мкл серотоніну антисироватки в кожну лунку.
4. Покрийте планшет з клейкою фольгою Струсніть пластину ретельно. Інкубуйте 16-20 годин (протягом ночі) при 2-8 ° C.
11.2.2. Другий день
1. Видаліть клейку фольгу. Видалити інкубаційний розчин. Промивайте планшет 3 х з 250мкл розбавленого промивного буфера. Видаліть надмірний розчин, натиснувши перевернутою пластиною на паперовий рушник.
2. Прокапайте 150мкл свіжоприготованого ферментного кон'югату в кожну лунку.
3. Покрийте пластину з клейкою фольгою. Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (500 об / хв) .
4. Видаліть клейку фольгу. Видалити інкубаційний розчин. Промивайте планшет 3 х з 250мкл розбавленого промивного буфера. Видаліть надмірний розчин, торкнувшись перевернутою пластиною паперового рушника.
5. Для додавання субстрату та стоп-розчину використовуйте, якщо доступна, 8-канальну мікропіпетку. Піпетування слід проводити в ті ж часові інтервали для субстрату та стоп розчина. Використовуйте позитивне заміщення та уникайте утворення повітряних бульбашок.
6. Прокапайте 200 мкл розчину субстрату ПНФФ у кожну лунку.

7.Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (500 об / хв) .
8. Зупиніть реакцію субстрату, додаючи до кожної лунки 50 мкл ПНФФ стоп розчину . Коротко змішуйте вміст, обережно струшуючи пластину.
9. Виміряйте оптичну густину фотометром при 405 нм (референтна довжина хвилі: 600-650 нм) протягом 60 хвилин після піпетування стоп-розчину.

12. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Результати випробувань дійсні лише тоді, коли аналіз було виконано відповідно до інструкцій. Більше того, користувач повинен суворо дотримуватися правил GLP (належної лабораторної практики) або аналогічних стандартів / законів. Користувач та / або лабораторія повинні мати перевірену систему для отримання діагнозу відповідно до GLP. Всі контролі повинні бути знайдені в межах прийнятного діапазону, як вказано на етикетках та сертифікаті якості. Якщо критерії не виконуються, пробіг недійсний, і його слід повторити. Кожна лабораторія повинна використовувати відомі зразки як додаткові засоби контролю. Рекомендується брати участь у відповідних випробуваннях з оцінки якості. У разі будь-якого відхилення необхідно підтвердити такі технічні питання: дати закінчення терміну придатності (підготовлених) реагентів, умови зберігання, піпетки, пристрої, умови інкубації та методи промивки.

13.РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Отримані ОГ стандартів (ось y, лінійні), наносяться навпроти їхньої концентрації (осі x, логарифмічна) на напівлогарифмічному графічному папері або за допомогою автоматизованого методу. Гарна відповідність забезпечується cubicspline, 4 логістичними параметрами або Logit-Log. Для розрахунку стандартної кривої застосовується кожен сигнал стандартів (в разі явних відхилень даних одного з двох повторів від очікуваного допустимо використовувати більш акуратне значення).

Концентрацію зразків можна читати безпосередньо зі стандартної кривої. Через розбавлення зразків значення повинні бути помножені на відповідний коефіцієнт, щоб отримати концентрацію серотоніну в нг / мл:

сироватка, сеча, тромбоцити, тканинні гомогенати, супернатанти клітинної культури, контролі: x 107 плазма вільна від тромбоцитів: x 23,5

Результати зразків підвищеного попереднього розведення повинні бути помножені з коефіцієнтом розведення.

Аналіз можна визнати дійсним, якщо виконано наступні критерії:

50% ОГ / ОГ макс (ED 50): 0,60 - 1,00 нг / мл (середня 0,8 нг / мл).

ΔОГ Стандарт A - Стандарт G: $\geq$ 0,80 ОГ.

Конверсія:

серотонін (нг / мл) x 5,67 = нмоль / л

Зразки з концентрацією вище найвищого стандарту повинні бути розведені, як описано в ІНСТРУКЦІЯХ ПЕРЕДТЕСТОВОГО НАЛАШТУВАННЯ та повторно аналізовані.

13.1. Розрахунок для тромбоцитів.

Зміст серотоніну в тромбоцитах відноситься до 10^9 тромбоцитів. Нижче наведено приклад:

Концентрація серотоніну: 100 нг / мл.

Кількість тромбоцитів у ПБТ: 300 000 / мкл, еквівалентне 60 000 000/200 мкл ПБТ та 200 мкл екстракційного об'єму. При використанні 20 мкл для аналізу це еквівалент тромбоцитів 6×10^6 тромбоцитів.

Вміст серотоніну дорівнює 1 мл. Тому використані еквівалентні тромбоцити 20 мкл повинні бути помножені на 50.

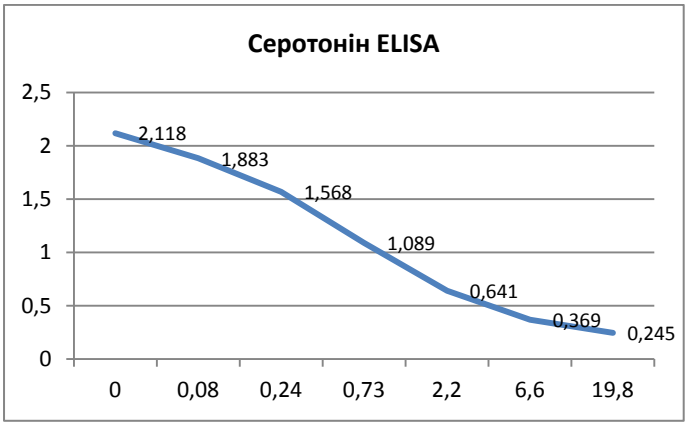
$6 \times 10^6 \times 50 = 0{,}3 \times 10^9$ тромбоцитів / мл із вмістом серотоніну 100 нг.

Отриманий вміст серотоніну у тромбоцитах становить

333 нг / 10^9 тромбоцитів (100 нг серотоніну x 1,0 x 10^9 / 0,3 x 10^9).

Типова калібрувальна крива
(Приклад Не використовуйте для розрахунку!)

Стандарт	Серотонін (нг/мл)	ОГ (середнє)	ОГ/ОГ середнє (%)
A	0.0	2.118	100.0
B	0.08	1.883	88.9
C	0.24	1.568	74.0
D	0.73	1.089	51.5
E	2.2	0.641	30.3
F	6.6	0.369	17.4
G	19.8	0.245	11.6



14. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ
Результати не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Вони повинні бути пов'язані з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.
Очевидно здорові особи демонструють такі значення: (97,5% процентів).

зразки	кількість	одиниці	середнє	діапазон
сироватка	99	Нг/мл	88,6	30-200
Вільна від тромбоцитів плазма	35	Нг/мл	3,7	1,8-7,5
тромбоцити	35	$Нг/10^9$ тромбоцитів	490	217-861
24 год сеча	49		83,1	≤ 200

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановила власний діапазон нормальних значень.

15.ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ
Збір та зберігання зразків мають значний вплив на результати випробувань. Див. "ЗБІР ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ" для деталей. Для перехресної реактивності див. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ.
Азид і тимеросал при концентрації> 0,1% втручаються в цей аналіз і можуть призводити до хибних результатів.
Наступні компоненти крові не мають суттєвого ефекту (+/- 20% очікуваного) на результати випробувань до вказаних нижче концентрацій:
гемоглобін 8,33 мг / мл
білірубін 0,33 мг / мл

16. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

Аналітична специфічність (перехресна реактивність)	речовина	Перехресна реактивність (%)		
	N- ацил серотонін	100		
	5 ГІАА	0,110		
	Мелатонін	0,040		
	5- метокси триптамін	0,015		
	3-індолакрилова кислота	< 0.01		
	Індол-3-піровиноградна кислота			
	3-індолацетатна кислота			
	5-метоксітриптофол			
	L-5-OH-триптофан			
Аналітична чутливість (Межа виявлення)	Середній сигнал (нульовий стандарт) - 2СВ (як прочитано зі стандартної кривої)			Протягом ночі: 0,014 нг / мл
				Коротка версія : 0,025 нг/мл
	Сироватка, сеча, тромбоцити, гомогенати тканини, клітинка Культура Супернатанти (помножена на коефіцієнт розведення)			Протягом ночі: 1,50 нг / мл
				Коротка версія : 2,68 нг/мл
	Плазма			Протягом ночі: 0,33 нг / мл

Точність		Діапазон (нг/мл)	CV (%)	
В аналізі	сироватка	91-327	3,8-6,6	
	сеча	114-625	4,8-8,2	
	плазма	7,1-247	3,7-11,5	
Між аналізами	сироватка	23-355	6,7-17,3	
	сеча	87-626	9,4-18,1	
	плазма	8,9-30	6,8-17,9	

Лінійність		Діапазон (нг/мл)	CV (%)	Діапазон (%)	
	сироватка	226-1503	1:16	90-125	
	сеча	677-1264	1:32	89-117	
	плазма	404-597	1:16	89-117	

Відновлення		Середнє (%)	Діапазон (%)	% відновлення після збагачення
	сироватка	104	85-119	
	сеча	98	85-116	
	плазма	100	83-120	

Метод порівняння з HPLC / іншими	сироватка	IBL-Assay = 0.90 x HPLC + 19.5	r = 0.945; n = 28
	сеча	IBL-Assay = 0.86 x + 20.0	r = 0.987; n = 32
	Тромбоцити*	IBL-Assay = 0.992 x HPLC + 0.008	r = 0.992; n = 50

*Reference: Kluge, H; Serotonin in Platelets; J Lab Med, 23 (6): 360-364 (1999)

17. КОРОТКИЙ ПРОТОКОЛ (ПРОТЯГОМ НОЧІ ТА КОРОТКА ВЕРСІЯ)

Загальний час аналізу	**< 5 год (коротка версія)**	**18-22 год (всю ніч)**	**18-22 год (всю ніч)**
Зразок	**Сироватка, сеча, тромбоцити-екстракт, тканинні гомогенати та контролі**	**Сироватка, сеча, тромбоцити-екстракт, тканинні гомогенати та контролі**	**Вільна від тромбоцитів плазма**

Попередня обробка зразка
Не ацилюйте стандарти! Вони вже ацильовані.
Ацилювання

Об'єм зразка	20 мкл	20 мкл	50 мкл
Розведений буфер аналізу	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Ацилюючий реагент	25 мкл	25 мкл	25 мкл
Умови інкубації, водяна баня	15 хв 37 °C	15 хв 37 °C	15 хв 37 °C
Розведений буфер аналізу	2000 мкл	2000 мкл	1000 мкл
центрифугування	10 хв при 1500x g	10 хв при 1500x g	10 хв при 1500x g

Піпетування мікропланшету

Стандарти (ацильовані зразки	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Серотонін біотін	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Серотонін антисироватка	50 мкл	50 мкл	50 мкл

Інкубація зразків

Час інкубації	90 хв	16-20 год	16-20 год
Температура інкубації	КТ (18-25 °C)	2-8 °C	2-8 °C
Умови інкубації	Шейкер 500 об/хв	Без шейкера	Без шейкера

Кроки промивки	3x250 мкл	3x250 мкл	3x250 мкл

Інкубація ферменту

Розведений ферментний кон'югат	150 мкл	200 мкл	200 мкл
Час інкубації	60 хв	30 хв	30 хв
Температура інкубації	Кімнатна температура (18-25 °C)	Кімнатна температура (18-25 °C)	Кімнатна температура (18-25 °C)
Умови інкубації	Шейкер 500 об/хв	Шейкер 500 об/хв	Шейкер 500 об/хв
Кроки промивки	3x250 мкл	3x250 мкл	3x250 мкл

Інкубація субстрату

Піпетування об’єму	200 мкл	200 мкл	200 мкл
Час інкубації	60 хв	30 хв	30 хв
Температура інкубації	Кімнатна температура (18-25 °C)	Кімнатна температура (18-25 °C)	Кімнатна температура (18-25 °C)
Умови інкубації	Шейкер 500 об/хв	Шейкер 500 об/хв	Шейкер 500 об/хв

Стоп розчин	50 мкл	50 мкл	50 мкл

Вимірювання оптичної густини	405 нм (референтна довжина хвилі 600-650 нм)

18**. ЛІТЕРАТУРА**

1. Lahiri, D. K., Ge, Y.-W., Sharman, E. H., Bondy, St. C., Age-related changes in serum melatonin in mice: higher levels of combined melatonin and 6-hydroxymelatonin sulfate in the cerebral cortex than serum, heart, liver and kidney tissues. J. Pineal Res. May 2004, Vol. 36, issue 4, 217-223

2. Bethea, C. L., Lu, N. Z., Reddy, A., Shlaes, T., Streicher, J. M., Whittemore, S. R., Characterization of reproductive steroid receptors and response to estrogen in a rat serotonergic cell line. Journal of Neuroscience Methods 127, 31-41 (2003). Address: Bethea, C. L., Oregon National Primate Research Center, Beaverton, USA.

3. Pan, J et al. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance regulator Modulates Neurosecretory Function in Pulmonary Neuroendocrine Cell-Related Tumor Cell Line Models. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Vol. 27, 553 – 560 (2002)

4. Khan, I., Thomas, P., Disruption of Neuroendocrine Control of Luteinizing Hormone Secretion by Aroclor 1254 involves Inhibition of Hypothalamic Tryptophan Hydroxylase Activity. Biology of Reproduction, 64, 955-964 (2001). Address: Khan, I.A., University of Texas at Austin, U.S.A.

5. Harenberg, J, Huhle, G., Giese Ch., Wang, L., Feuring, M., Song, X., Hofmann, U.: Determination of serotonin release from platelets by enzyme immunoassay in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. British Journal of Hematology, 109, 182-186 (2000) Address: Harenberg J., University of Heidelberg, Germany

6. Kluge, H., Bolle, M., Reuter, R., Werner, S., Zahlten, W., Prudlo, J., Serotonin in Platelets: Comparative Analyses using New Enzyme Immunoassay and HPLC Test Kits and the Traditional Fluorimetric Procedure. J Lab Med, 23 (6): 360-364 (1999) Address: Kluge, H., University of Jena, Germany

7. Balaskas, E., Bamihas, G., Karamouzis M., Voyiatzis, G., Tourkantonis, A. Histamine and Serotonin in uremic pruritus: effect of ondansetron in CAPD-pruritic patients. Nephron, 78:395-402 (1998) Address: Elias Balaskas, MD Ahepa University Hospital, Thessaloniki, Greece

8. Sprott,H., Kluge,H., Franke,S, Hein,G. Altered Serotonin-Levels in Patients with Fibromyalgia. In: Journal of Musculoskeletal Pain, Abstracts from the 3rd World Congress on Myofascial Pain and Fibromyalgia San Antonio, Texas, USA, Editor: I. J. Russel, p. 65. (1995) Address: Kluge,H., University of Jena, Jena, Germany

9. Thomas Stratz, Wlodzimierz Samborski, Pawel Hrycaj, Thomas Pap, Stefan Mackiewicz, Pierre Mennet, Wolfgang Müller Die Serotoninkonzentration im Serum bei Patienten mit generalisierter Tendomyopathie (Fibromyalgie) und chronischer Polyarthritis. In: Medizinische Klinik, 88, 458-462 (1993).
Address: Thomas Stratz, Hochrhein-Institut für Rheumaforschung und Rheumaprävention, Bad Säckingen/Rheinfelden, Germany

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF	№ Кат.:
LOT	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
CONC	Концентрат
LYO	Ліофілізований
IVD	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати поодаль від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

СКАРГИ: Первинно скарги можна пред’явити в письмовому вигляді або усно. Згодом необхідно подати їх, включаючи хід дослідження та отримані результати, в письмовому вигляді, з аналітичних міркувань.

ГАРАНТІЯ: Гарантується відсутність у продукті дефектних матеріалів у межах відповідного терміну придатності, а також дотримання специфікацій, поданих разом із продуктом. Продукт слід використовувати за призначенням, відповідно до всіх інструкцій, наведених в інструкції з використання та в межах відповідного терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури аналізу, або обміну, або змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки анулюють будь-які вимоги про заміну.

ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ: ЗА БУДЬ-ЯКИХ ОБСТАВИН РІВЕНЬ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЗАКУПІВЕЛЬНОЮ ВАРТІСТЮ ВКАЗАНОГО (-ИХ)НАБОРУ(ІВ) . ЗА ЖОДНИХ УМОВ ВИРОБНИК НЕ МАЄ НЕСТИ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ЗА ВИПАДКОВІ ЧИ ПОБІЧНІ ЗБИТКИ, У ТОМУ ЧИСЛІ ВТРАТУ ПРИБУТКУ, ВТРАТУ ПРОДАЖ, ТРАВМИ ЛЮДЕЙ ЧИ ПОШКОДЖЕННЯ ВЛАСНОСТІ АБО ІНШІ ВИПАДКОВІ ЧИ НЕПРЯМІ ЗБИТКИ.

IBL International GmbH
Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург, Німеччина

Тел .: + 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
E-MAIL: IBL@IBL-International.com
WEB: http://www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua