

SEROTONINA NO SORO/PLASMA/SANGUE TOTAL (HPLC)

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Serotonina no Soro/Plasma/Sangue total por HPLC.

Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
3030	Kit Reagente para Análise de Serotonina em Soro/Plasma/Sangue Total (100 análises)

Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para análise de Serotonina no Soro / Plasma / Sangue total por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit de reagentes foi desenvolvido para análise de serotonina em amostras de soro, plasma e sangue total empregando um sistema isocrático de HPLC com detector eletroquímico. Através de um procedimento rápido e seguro, o Kit garante a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. Este kit tem como uso pretendido o monitoramento de pacientes com suspeitas de tumores secretores de serotonina. Atualmente, a determinação de serotonina ou do seu metabólito 5-HIAA faz parte do diagnóstico padrão em casos de suspeita de síndrome carcinoide.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica.

PRINCÍPIO

A técnica de detecção eletroquímica mais empregada na cromatografia líquida é a amperométrica, com potencial de trabalho constante. Os detectores amperométricos convencionais utilizam uma célula com três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um terceiro eletrodo que atua na manutenção do potencial e previne a flutuação de corrente elétrica no eletrodo de referência. O potencial necessário para as reações de oxidação ou redução (potencial de polarização), é aplicado entre o eletrodo de referência (geralmente Ag/AgCl) e o eletrodo de trabalho. Qualquer substância ativa eletroquimicamente que passe através da célula de detecção será oxidada ou reduzida. As transformações por oxidação ou redução de tal substância geram uma perda ou ganho de elétrons, resultando em uma corrente elétrica que pode ser detectada e medida pelo instrumento, amplificada e registrada como um sinal cromatográfico. Uma vez que somente um número limitado de grupos funcionais e estruturas químicas são susceptíveis a processos de oxi-redução, em um determinado potencial de trabalho, a detecção eletroquímica é caracterizada por sua alta sensibilidade e sua elevada seletividade.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução metanólica em tampão acetato	1000 ml
Padrão de Calibração (Calibration Standard)	Solução hidro alcoólica de serotonina (250 ng/ml)	1 x 10 ml
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução aquosa de N-metilserotonina (250 ng/ml)	1 x 10 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Solução metanólica	1 x 10 ml
Frascos de Reação (Reaction vials)	-	100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada no rótulo, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas.

Artigo	Produto	Armazenamento
3031	Fase Móvel	18 - 30 °C
3033	Padrão de Calibração (líquido)	2 - 8 °C
3034	Padrão Interno	2 - 8 °C
3035	Reagente de Precipitação	18 - 30 °C

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Favor consultar a ficha de segurança dos reagentes e adotar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto. As instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

DESCARTE

A fase móvel, o reagente de precipitação e o padrão de calibração contêm solventes orgânicos (metanol) e devem ser descartados como resíduos químicos livres de halogênio, de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Padrão Interno: pronto para uso.

Reagente de Precipitação: pronto para uso.

Padrão de Calibração (líquido): pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna Cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 3130).
Padrão de Calibração em Soro, liofilizado (Chromsystems art. 3009).

Controle Endócrino em Plasma, Nível Normal (Chromsystems art. 0010).

Controle Endócrino em Plasma, Nível Patológico (Chromsystems art. 0020)

Água tipo I ou grau HPLC.

Centrífuga.

Metanol grau HPLC.

Material geral de laboratório.

AMOSTRA

Podem ser analisadas amostras de soro, plasma ou sangue total, coletadas de indivíduos submetidos a uma dieta restritiva para alimentos que contenham serotonina. A amostra deve ser coletada preferencialmente pela manhã e mantida em gelo, devendo ser analisada no mesmo período do dia. A serotonina está localizada principalmente nas plaquetas (aprox. 97%).

Estabilidade da amostra: se a análise for realizada dentro de um período de 12 horas, as amostras coletadas podem ser mantidas a +4°C. Para períodos maiores de armazenamento, conservar a -20 °C.

Amostras de soro: tome os devidos cuidados para a destruição completa das plaquetas. Somente dessa forma a determinação total de serotonina é possível. Recomendação: coagulação intensiva com o uso de tubos de soro com ativador de coágulo. Centrifugue por 10 min a 1500 x g.

Amostras de plasma (plasma pobre em plaquetas): quando medir serotonina em plasma, é essencial a obtenção de plasma livre de células sem a destruição de plaquetas. Para este propósito, é necessário a adição de anticoagulante. Recomendação: centrifugação mínima de 15 min a 2000-3000 x g.

Concentrado de plaquetas: para a separação de plaquetas use sangue total com anticoagulante (EDTA ou heparina, mesmo tubo que coleta de plasma) e centrifugue a baixa velocidade (1500 rpm, 15 min). O plasma rico em plaquetas obtido é centrifugado novamente em alta velocidade (4000-5000 rpm, 5 a 10 min), e o concentrado de plaquetas pode ser coletado do fundo do tubo.

Estabilidade das amostras preparadas (elutos): as amostras preparadas são estáveis à temperatura ambiente por 24 horas e por até 48 horas entre +2 a +8°C. Para períodos maiores de armazenamento, conservar a -20 °C.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção de 20µL Tempo de corrida 9 min.
Fluxo:	1.0 a 1.2 ml/min
Detector Eletroquímico:	+400 a +500mV
Temperatura da coluna:	Ambiente (aprox. 25 °C)

Procedimento de preparo de amostras:

Preparo de amostras de soro:

1. Adicionar 100 µl de soro (ou calibrador ou controle)
2. Adicionar 100 µl de Padrão Interno
3. Adicionar 100 µl de Reagente de Precipitação
4. Agitar por 30 s (vortex)
5. Incubar por 10 min entre +2 a +8 °C
6. Centrifugar por 10 min a 16000 x g.
7. Injetar 20 µl do sobrenadante no sistema HPLC.

Preparo de amostras de plasma (pobre em plaquetas):

Para análises de serotonina em plasma, é necessário diluir o padrão de calibração (art. 3033 ou 3009) e o padrão interno (art. 3034), na proporção de 1 para 10 partes de água grau HPLC. Na avaliação quantitativa, o fator "10" de diluição deve ser compensado.

1. Adicionar 100 µl de plasma no frasco de reação
2. Adicionar 100 µl de Padrão Interno, diluído 1:10 com água ultrapura (grau HPLC)
3. Adicionar 100 µl do Reagente de Precipitação
4. Agitar por 30 s (vortex)
5. Incubar por 10 min entre +2 a +8 °C
6. Centrifugar por 10 min a 16000 x g.
7. Injetar 20 µl do sobrenadante no sistema HPLC.

Preparo de amostras de sangue total:

1. Adicionar 50 µl de sangue total (EDTA, heparina) no frasco de reação
2. Adicionar 50 µl de água ultrapura (grau HPLC)
3. Adicionar 100 µl de Padrão Interno
4. **Incubar a amostra por 10 minutos em temperatura ambiente!**
5. Adicionar 100 µl de Reagente de Precipitação
6. Agitar por 30 s (vortex)
7. Incubar por 10 min entre +2 a +8 °C
8. Centrifugar por 10 min a 16000 x g.
9. Injetar 20 µl do sobrenadante no sistema HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. (Fluxo de 1ml/min)
Serotonina	5.0 min
Padrão Interno	6.5 min

CÁLCULOS

$$C_{\text{Amostra}} (\mu\text{g/l}) = \frac{A_{\text{Amostra}} \times I_{\text{Calibrador}}}{A_{\text{Calibrador}} \times I_{\text{Amostra}}} \times C_{\text{Calibrador}}$$

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra	= Aamostra
Área ou altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador	= Calibrador
Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra	= ISAmostra
Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador	= ISCalibrador
Concentração C do analito A no calibrador	= *CCalibrador

Concentração do Padrão Interno:

N-metilserotonina	0.5 ng/µl
-------------------	-----------

100 µl da solução de Padrão Interno (0.5 ng/µl) são adicionados a 100 µl de soro. A concentração final de Padrão Interno na amostra é de 500 ng/ml (500 µg/l).

*Concentrações do calibrador aquoso (artigo 3033):

Analito	Concentração
Serotonina	250 ng/ml (250 µg/l)
Padrão Interno	1

Fatores de conversão:

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Serotonina	x 5,6747	x 0,1762

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos para calibrar e monitorar a precisão e exatidão das análises:

Artigo	Produto	Apresentação
3009	Padrão de Calibração de Serotonina em Soro (liofilizado)	5 x 1ml
0010	Controle Endócrino em Plasma, Nível Normal	10 x 5 ml
0020	Controle Endócrino em Plasma, Nível Patológico	10 x 5 ml

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Linearidade / Limite de quantificação:

O método é linear a partir do limite de quantificação designado até o limite superior.

Analito	Limite de quantificação* Aprox. [$\mu\text{g/l}$]	Faixa linear de até pelo menos [$\mu\text{g/l}$]
Serotonina	3	1000

*O limite de quantificação depende das condições do eletrodo de trabalho.

Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir do *slope* das curvas de calibração de amostras de soro, plasma e sangue total fortificadas e soluções padrões diluídas:

Matriz	Taxa de recuperação Serotonina [%]	Taxa de recuperação Padrão Interno [%]
Soro	98	96
Plasma	95	94
Sangue total	87	90

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada por múltiplos preparos da mesma amostra (n=10) e determinação de serotonina em 3 diferentes concentrações.

Analito	Coeficiente de variação [%] (a concentração em $\mu\text{g/l}$)		
	n=10	n=10	n=10
Serotonina	1.3 (157)	0.4 (225)	1.6 (324)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada por 4 preparos da amostra e determinação da concentração do analito em 2 pools de plasma em 20 diferentes séries de testes.

Analito	Coeficiente de variação [%] (a concentração em $\mu\text{g/l}$)	
	n=80	n=80
Serotonina	1.2 (150)	1.0 (347)

VALORES DE REFERÊNCIA

Matriz	Faixa de referência	Fonte
Soro	227-1135 nmol/l (40-200 $\mu\text{g/l}$)	14
Plasma EDTA	284-1873 nmol/l (50-330 $\mu\text{g/l}$)	14
Sangue Total	385-1319 nmol/l (68-232 $\mu\text{g/l}$)	15
Plasma pobre em plaqueta	0.86-16.96 nmol/l (0.15-2.99 $\mu\text{g/l}$)	15
Plasma rico em plaqueta	2.5-6.1 nmol/l 10^9 plaquetas	16
Recém-nascidos (plasma rico em plaqueta)	1.67 \pm 0.74 nmol/l 10^9 plaquetas	17

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência para adaptar o método às características de sua população.

LITERATURA

1. Smythe GA., Serotonin. In: Gray CH; v James HT., (Editors), Hormones in Blood 3., Academic Press, New York, 125-134 (1983).
2. Cooper JR, Bloom RH., The biochemical basis of neuropharmacology. 5th, New York, Oxford University Press, (1986).
3. Stoward PJ., The possible role of 5-Hydroxytryptamine in Duchenne's muscular dystrophy. In: de Clerck F., Vanhoutte PM., (Editors), 5- Hydroxytryptamine in peripheral reactions, Raven Press, New York (1982).
4. Keller R., Greiling H., Gressner AG., In: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, Schattauer Verlag, Stuttgart (1987).
5. Stahl SM, Wood DJ, Mefford IN, Berger PA, Ciaranello RD. Hyperserotonemia and platelet serotonin uptake and release in schizophrenia and affective disorders, Am J. Psychiatry 140(1): 26-30 (1983).
6. Grahame-Smith DG., The carcinoid syndrome. In: Truelove SC, Lee E., (Editors), Topics in gastroenterology, Blackwells, London (1972).
7. Kuhn DM., Lovenberg W., Assay of serotonin, related metabolites and tryptophan hydroxylase, Methods in biogenic amine research, Chapter 23, Elsevier Science Publishers B. V. (1983).
8. Manz B., Radioimmunoassay of human serum serotonin, J. Clin. Biochem. 23(10): 657-62 (1985).
9. Mailman R., Kilts CD., Analytical considerations for quantitative determination of serotonin and its metabolically related products in biological matrices, Clin. Chem. 31(11): 1849-54 (1985).
10. Picard M., Olichon D., Gombert J., Determination of serotonin in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection, J. Chromatogr. 341(2): 445-51 (1985).
11. Jouve J., Martineau J., Mariotte N., Barthelemy C., Muh J.P., Lelord G., Determination of urinary serotonin using liquid chromatography with electrochemical detection, J. Chromatogr. 378(2): 437-43 (1986).
12. Tagari P.C., Boullin D.J., Davies C.L. Simplified determination of serotonin in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection, Clin Chem 30/1:131-135 (1984).
13. Kitzrow W, Arbeitsgruppe Neurobiologie Prof. Ueblhack, Universitätsklinikum Charité-Psychiatrische Klinik, Berlin (1993-1998).
14. Gressner AM, Arndt T (Hrsg). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, Band 1 - Klinische Chemie 1. Aufl, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2007).
15. Hirowatari Y, Hara K, Shimura Y, Takahashi H. Serotonin level in platelets-poor plasma and whole blood from healthy subjects: relationship with lipid markers and coronary heart disease risk score. J Atheroscler Thromb 18(10): 874-82 (2011).
16. Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 7. Aufl, Th-Books Verlagsgesellschaft Frankfurt/Main, (2008).
17. Flachaire E, Beney C, Berthier A, Salandre J, Quincy C, Renaud B. Determination of reference values for serotonin concentration in platelets of healthy newborns, children, adults, and elderly subjects by HPLC with electrochemical detection. Clin Chem 36(12): 2117-20, (1990).
18. Brand T, Anderson GM. The measurement of platelet-poor plasma serotonin: A systematic review of prior reports and recommendations for improved analysis. Clin Chem 57(10): 1376-86, (2011).
19. Guder WG, Ehret W, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Müller-Plathe O, Töpfer G, Wissner H, Zawta B. Serum, Plasma oder Vollblut? Welche Antikoagulantien? Empfehlungen der Arbeitsgruppe Präanalytik der Dt. Gesellschaft für Klinische Chemie und der Dt. Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin. DG Klinische Chemie Mitteilungen 29(3): 81-103, (1998).

Símbolos Usados

-  Fabricante
-  Limites de temperatura
-  Diagnóstico in vitro
-  Cuidado, consulte documentos anexos
-  Consulte instruções de uso
-  Material Reciclável
-  Não rejeitar diretamente para o ambiente
-  Lote
-  Data de Fabricação
-  Validade
-  Risco Biológico
-  Altamente tóxico
-  Corrosivo
-  Nocivo

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Importado e Distribuído por: BioSys Ltda
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
Cep: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79
MS – nº 10350840120
SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414
www.biosys.com.br