

SEROTONINA (5-IDROSSITRIPTAMINA) URINARIA – FAST – Codice Z15610 (in Fluorimetria)

BIOCHIMICA

La **Serotonina (PM=176,22)** è un composto biologico che presenta, come unità strutturale, il gruppo **indolico**. Deriva dalla biotrasformazione (idrossilazione e decarbossilazione) dell'aminoacido **Triptofano**, e tale gruppo viene chiamato triptaminico. Il metabolismo inizia con la trasformazione del Triptofano in **5-Idrossitriptofano** ad opera della triptofano-idrossilasi e prosegue con la successiva decarbossilazione che porta alla formazione della **5-Idrossitriptamina (Serotonina)**; questa viene deaminata ossidativamente a livello del fegato ad opera della **MonoAminoOssidasi (MAO)** e trasformata in **Acido 5-Idrossiindolacetico** che viene eliminato con le urine sia in forma libera che coniugato con l'**Acido glucuronico** (fig. 1). Nel sangue la **Serotonina** è veicolata dalle piastrine.

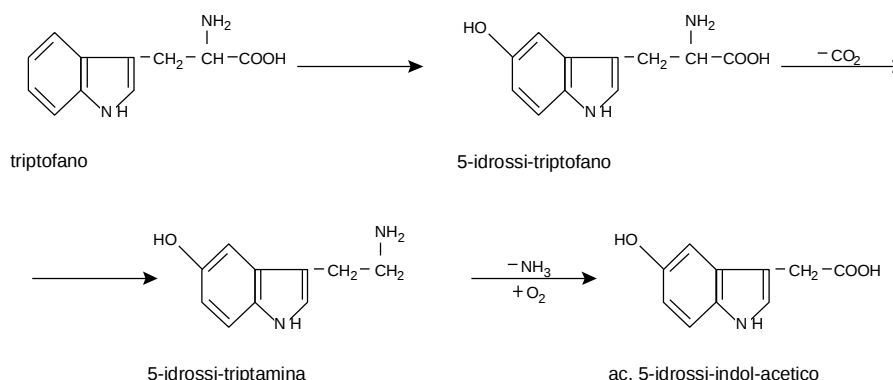


Figura 1: Metabolismo del triptofano.

PATOLOGIA

La **Serotonina** è una ammina dotata di importanti e molteplici effetti biologici; stimola la contrazione della muscolatura liscia del tubo gastroenterico, dei bronchi, della vescica, dei vasi sanguigni, oltre che essere coinvolta nella funzione cerebrale e nel meccanismo dell'emostasi. Al riversamento in circolo di elevate quantità di **Serotonina** è dovuta una serie di alterazioni di meccanismi funzionali e di alterazioni anatomiche che, nel loro insieme, formano il quadro della sindrome da carcinoide; disturbi intestinali, circolatori, cutanei (flush), senso di calore, tachicardia, fenomeni asmatici, cefalee e nel tempo si può instaurare una sclerosi delle valvole semilunari polmonari e della tricuspide. La diagnosi di "**sindrome carcinoide**" si basa, oltre che sulla sintomatologia clinica, sulla dimostrazione di un aumento nel sangue della **Serotonina** e di una aumentata eliminazione urinaria di **Acido 5-Idrossiindolacetico**.

CHIMICA E DOSAGGIO MEDIANTE TECNICA HPLC

Il presente metodo presenta il vantaggio di poter analizzare la **Serotonina** direttamente sulle urine attraverso la purificazione in colonne clean-up e senza alcun trattamento e derivatizzazione della stessa e determinarla in modo quantitativo in HPLC .



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

N° 004	Serotonina urinaria in Fluorimetria - FAST	10/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo :

La **Serotonina o 5-Idrossitriptamina o 5 HT** viene analizzata dopo purificazione delle urine mediante colonna di clean-up ed opportuni reagenti. 50 µl di eluato vengono direttamente iniettati in HPLC.

Recupero del Metodo :

>98 %

Sensibilità Analitica (LLOD) :

2 µg/l

Minima Concentrazione Analizzabile (LLOQ):

5 µg/l

Linearità del Metodo :

5 – 7500 µg/l

Accuratezza intra serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
25 µg/l	125 µg/l
12,0%	2,7%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
25 µg/l	125 µg/l
13,0%	3,7%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) :

Cl	Cm	Cs
5 µg/l	75 µg/l	250 µg/l
5,4%	2,0%	1,5%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) :

Cl	Cm	Cs
5 µg/l	75 µg/l	250 µg/l
8,9%	4,4%	2,4%

Coefficiente di correlazione R² + Dev Std

0,9917 ± 0,0049

Valori di Normalità nelle urine delle 24h:

26,6 – 182 µg/24h

Contenuto della confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso, e stabili 3 anni a Temperatura Ambiente (≤ 20 °C). Il Calibratore è stabile 36 mesi a 2–8 °C.

Reagente A – Soluzione di Condizionamento 1, **1 x 120 ml**

Reagente B - Soluzione di Condizionamento 2, **1 x 110 ml**

Reagente C – Soluzione di Diluizione, **1 x 75 ml**

Reagente D – Soluzione di Lavaggio 1, **1 x 120 ml**

Reagente E – Soluzione di Lavaggio 2, **1 x 110 ml**

Reagente F – Soluzione Eluente, **1 x 120 ml**

Reagente G – Soluzione Test, **1 x 5 ml**

Stoccare a 2-8 °C

Reagente H – Soluzione Standard Interno, **1 x 10 ml**

Reagente I – Soluzione Stabilizzante, **1 x 40 ml**

Calibratore Urinario Liofilo, **1 x 5 ml**

Codice Z15516

Reagente M - Fase mobile, **3 x 500 ml**

Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

Colonne di Clean-up, **100 pz**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Detector Fluorimetrico $\lambda_{ex}=285\text{ nm}$ $\lambda_{em}=344\text{ nm}$
Registratore di cromatogrammi

Modalità di raccolta delle Urine delle 24 h :

Prima di iniziare la raccolta versare nel recipiente circa 5 ml di HCl 5 M per ogni litro di Urina che presumibilmente verrà emessa. Per la raccolta di una persona adulta occorreranno circa 10 ml. Per la raccolta di un bambino occorreranno circa 5 ml. Un campione di circa 10 ml di urina delle 24 h va prelevato ed inviato al Laboratorio con l'indicazione della diuresi totale. Controllare che le urine pervenute abbiano un pH tra 2,0 e 4,0.

Se il pH è > di 7 il campione potrebbe non essere idoneo per il test.

Congelare il campione a -20 °C se l'analisi deve essere differita. Stabili oltre 2 mesi.

Fase pre-analitica :

Scongelare velocemente il campione urinario e analizzarlo immediatamente.

PROCEDURA PREANALITICA

Preparazione della Soluzione Test

In una provetta pipettare:

- 750 µl di H₂O di grado HPLC
- 200 µl **Reagente G – Soluzione Test**
- 50 µl **Reagente H – Sol. Standard Interno**

Al vortex per 10 secondi

INIEZIONE :

Iniettare 5 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma. Verificare che la Sol. Test abbia un tempo di ritenzione simile a quello riportato in fig. 2. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico. **Importante** : Questo Test non deve essere usato come calibratore

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Attivazione delle Colonne Clean-up

Pipettare in sequenza nelle rispettive Colonne di Clean-up :

- 1,0 ml di **Reagente A – Condizionamento 1** e gettare il liquido percolato. *Non portare a secco!*
- 1,0 ml di **Reagente B – Condizionamento 2** e gettare il liquido percolato. *Non portare a secco!*

FASE 2 : Preparazione dei Campioni e del Calibratore

Verificare che il **pH** del calibratore, dei controlli e dei campioni sia compreso tra **6,0** e **7,0**; eventualmente correggerlo con aggiunta di poca quantità di NaOH 1N o HCl 1N.

Dispensare in provette idonee:

	Calibratore	Campione	Controllo
Reagente C – Sol. Diluente	750 µl	750 µl	750 µl
Calibratore	200 µl		
Campione		200 µl	
Controllo			200 µl
Reagente H – Sol. Standard Interno	50 µl	50 µl	50 µl

Al vortex per 10 secondi

FASE 3 : Caricamento dei Campioni

Pipettare nelle rispettive Colonne Clean-up i campioni preparati nella precedente **FASE 2**

FASE 4: Pulizia dei campioni caricati nelle colonne Clean-up

Pipettare nelle colonne Clean-up, in sequenza:

- 1,0 ml di **Reagente D - Sol. di lavaggio 1** *Gettare il liquido percolato.*
- 1,0 ml di **Reagente E - Sol. di lavaggio 2** *Gettare il liquido percolato.*

FASE 5 : Eluizione

Pipettare nelle colonne Clean-up:

- 1,0 ml di **Reagente F – Soluzione Eluente** *Raccogliere il liquido percolato.*

Al vortex per 10 secondi

FASE 6 : Prelevare 200 µl di eluato e aggiungere 400 µl di **Reagente I – Soluzione Stabilizzante**

Al vortex per 10 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 2 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE:

- Iniettare 5 µl nel cromatografo HPLC e attendere la stampa del cromatogramma.

SEROTONINA URINARIA - Avvertenze

REAGENTE G : SOLUZIONE TEST

SEROTONINA	circa 880 µg/l
------------	----------------

PARAMETRI DEL DETECTOR - VARIAN SPETTROFLUORIMETRO mod. 363

λ DI ECCITAZIONE	285 nm
λ DI EMISSIONE	344 nm
SENSIBILITA' STRUMENTALE	2 - Medium

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare il sistema completo POROSHELL 120 EC-C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 µ) è tassativo l'uso del Prefiltri Javelin (1 x 10 pz), cod. S90199511.
--

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica <u>nuova</u> POROSHELL 120 EC-C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 µ). Disconnettere il detector Fluorimetrico e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Metanolo (20 : 80 v / v) al flusso di 1,0 ml/minuto. Non riciclare i liquidi di lavaggio. Far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Metanolo (80 : 20 v / v) al flusso di 1,0 ml/minuto. Non riciclare i liquidi di lavaggio. Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1 ml/minuto e scaricare i primi 20 ml. Al termine, iniettare il test chimico e verificare la congruità della separazione. NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase. Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.
--

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare 15 ml di H₂O : Acetonitrile o Metanolo (80 : 20 v / v) al flusso di 1,0 ml/minuto e scaricare. Flussare una soluzione di H₂O : Acetonitrile o Metanolo (30 : 70 v / v) per 30 minuti scaricandola. Si raccomanda di eseguire il lavaggio della Colonna Analitica alla fine di ogni seduta analitica. La colonna va stoccata in una soluzione di H₂O : Acetonitrile o Metanolo (30 : 70 v / v)
--

LAVAGGIO AGO INIEZIONE

Lavare con una soluzione di Acqua / Etanolo o Metanolo o Acetonitrile (80 : 20 v/v).
--

PARAMETRI HPLC

LOOP	5 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,0 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 80 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z15516	Calibratore liofilo in urina per Serotonina	4 x 5 ml
Z15519	Controllo liofilo in urina per Serotonina, Livelli 1 e 2	2 x 5 x 5 ml
Z699975902	Colonna Analitica Poroshell 120-EC-C 18 (50 x 4,6mm –2,7 µm)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 PZ

SEROTONINA URINARIA

(Cromatogrammi di Riferimento)

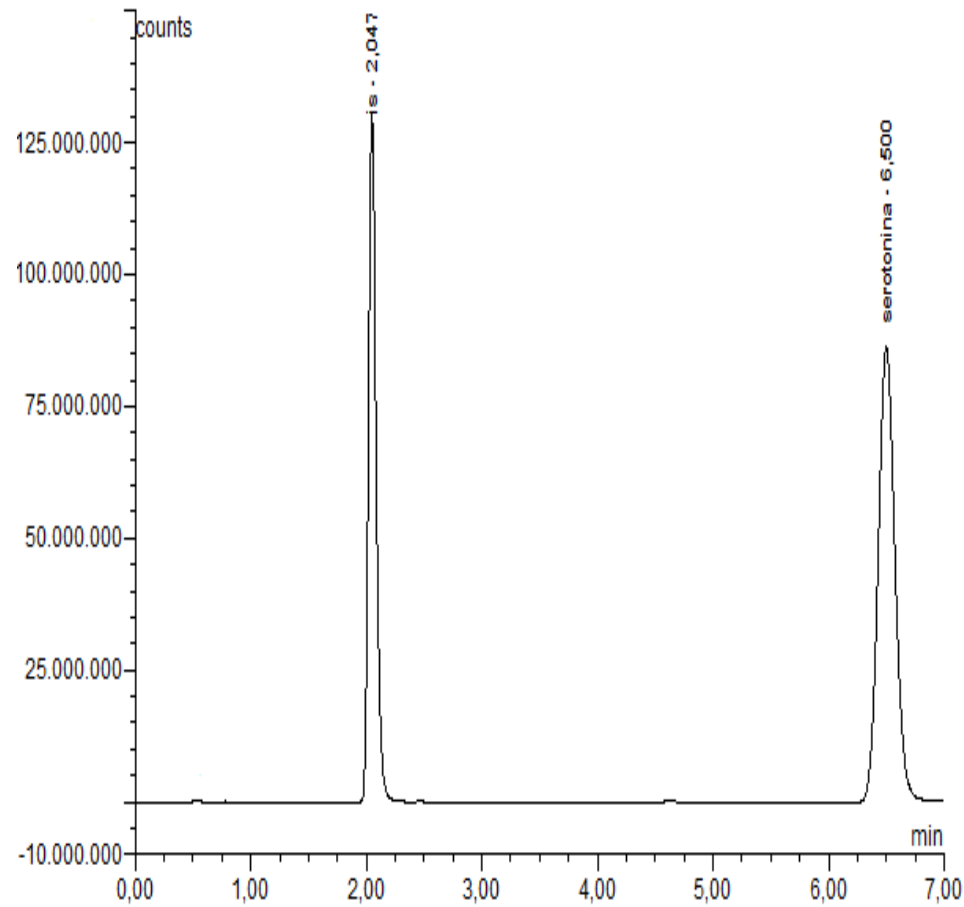


Fig. 2 :	Soluzione Test
	R.T. 2.0 Standard Interno
	R.T. 6.5 Serotonina

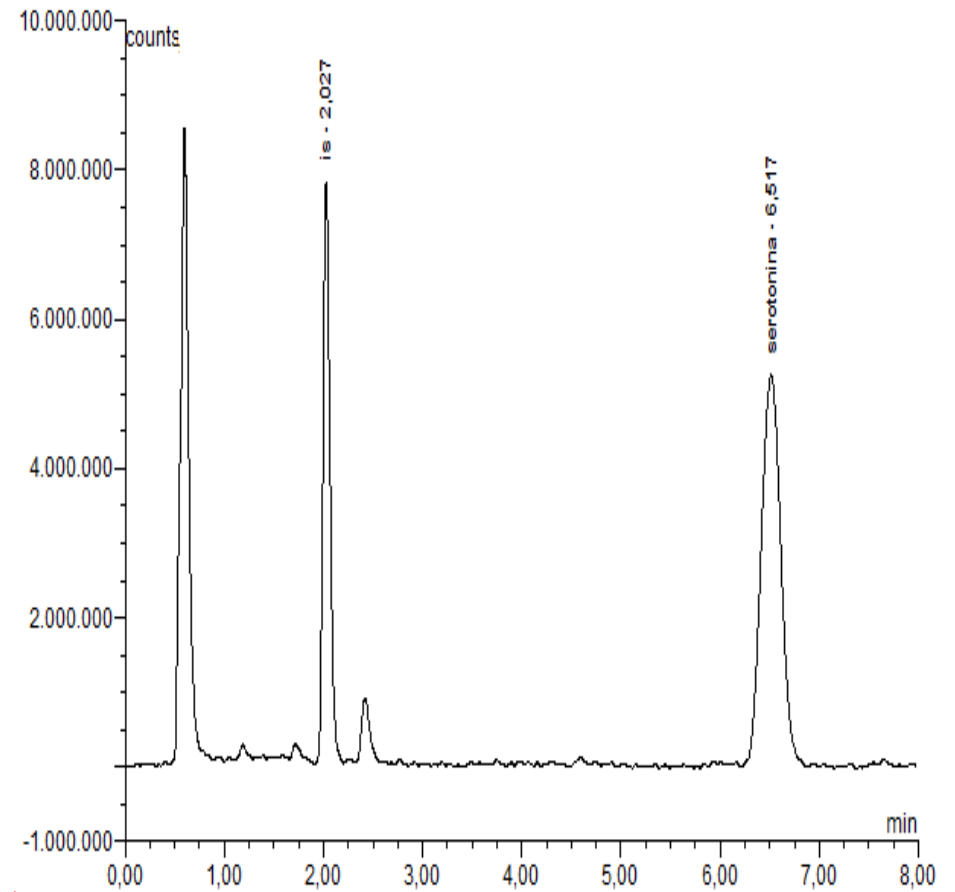


Fig. 3 :	Calibratore liofilo urinario
	R.T. 2.0 Standard Interno
	R.T. 6.5 Serotonina 285,9 µg/l

SEROTONINA URINARIA

(Cromatogrammi di Riferimento)

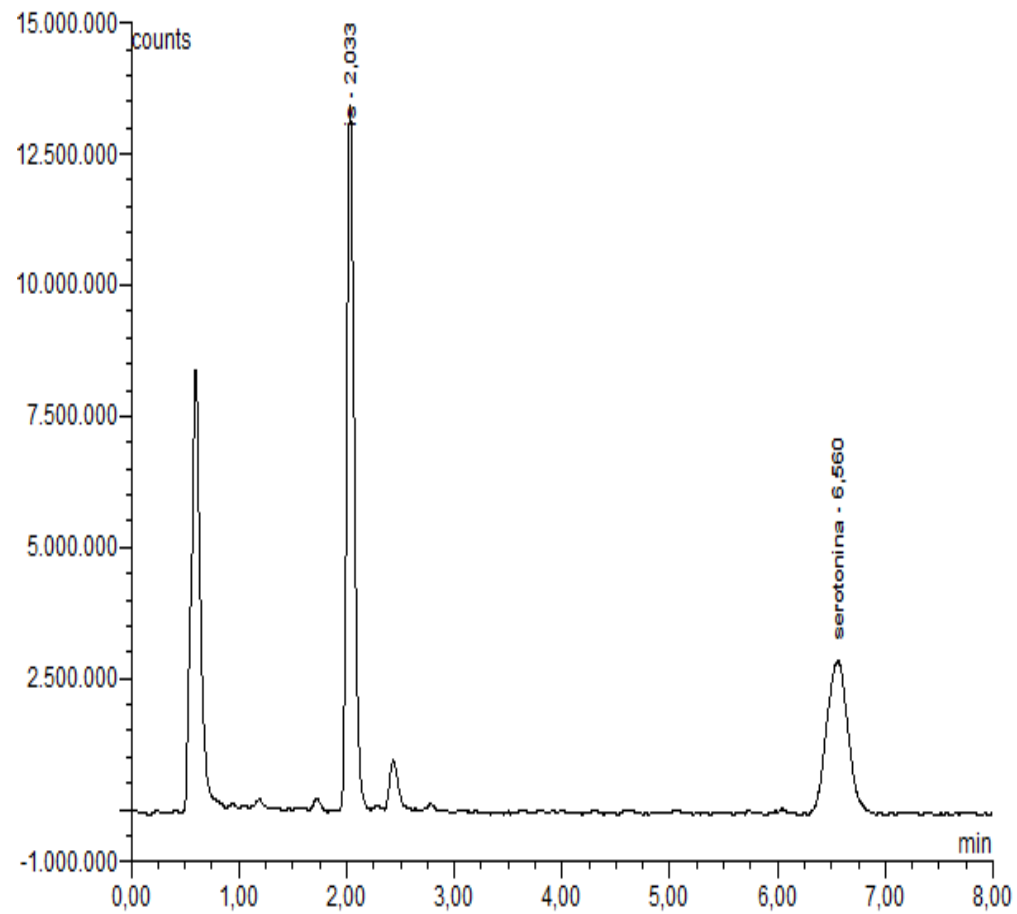


Fig. 4 :	Controllo liofilo urinario livello 1
	R.T. 2.0 Standard Interno
	R.T. 6.5 Serotonina 149,0 µg/l

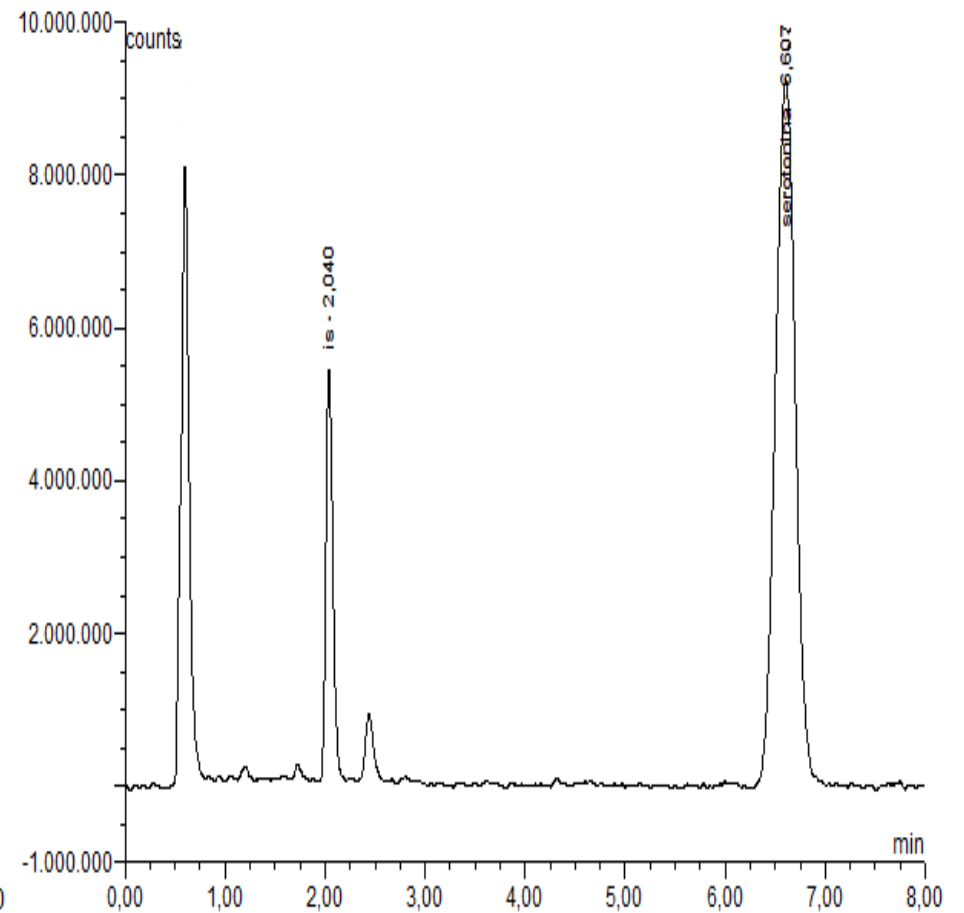


Fig. 5 :	Controllo liofilo urinario livello 2
	R.T. 2.0 Standard Interno
	R.T. 6.6 Serotonina 463,9 µg/l