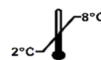


Instructions for use / Gebrauchsanweisung
Serotonin ELISA Fast Track

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

REF

BA E-8900



IVD

CE

96

Table of contents

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Introduction | 4 |
| 1.1 | Intended use and principle of the test | 4 |
| 1.2 | Clinical application | 4 |
| 2. | Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations | 4 |
| 2.1 | Procedural cautions, guidelines and warnings | 4 |
| 2.2 | Limitations | 5 |
| 2.2.1 | Interfering substances and proper handling of specimens | 5 |
| 2.2.2 | Drug and food interferences | 5 |
| 2.2.3 | High-Dose-Hook effect | 5 |
| 3. | Storage and stability | 5 |
| 4. | Materials | 6 |
| 4.1 | Contents of the kit | 6 |
| 4.2 | Calibration and Controls | 6 |
| 4.3 | Additional materials required but not provided in the kit | 7 |
| 4.4 | Additional equipment required but not provided in the kit | 7 |
| 5. | Sample collection and storage | 7 |
| 6. | Test procedure | 7 |
| 6.1 | Preparation of reagents and further notes | 8 |
| 6.2 | Preparation of samples – Acylation | 8 |
| 6.3 | Serotonin ELISA | 8 |
| 7. | Calculation of results | 8 |
| 7.1 | Expected reference value | 9 |
| 7.2 | Typical standard curve | 9 |
| 8. | Quality control | 9 |
| 9. | Assay characteristics | 10 |
| 9.1 | Performance data | 10 |
| 9.2 | Metrological Traceability | 11 |
| 10. | References/Literature | 11 |
| 11. | Changes | 12 |

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

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Einleitung | 13 |
| 1.1 | Verwendungszweck und Testprinzip | 13 |
| 1.2 | Klinische Anwendung | 13 |
| 2. | Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen | 13 |
| 2.1 | Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen | 13 |
| 2.2 | Grenzen des Tests | 14 |
| 2.2.1 | Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben | 14 |
| 2.2.2 | Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel | 15 |
| 2.2.3 | High-Dose-Hook Effekt | 15 |
| 3. | Lagerung und Haltbarkeit | 15 |
| 4. | Materialien | 15 |
| 4.1 | Reagenzien im Kit | 15 |
| 4.2 | Kalibratoren und Kontrollen | 16 |
| 4.3 | Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien | 16 |
| 4.4 | Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte | 16 |
| 5. | Probenbehandlung und Lagerung | 16 |
| 6. | Testdurchführung | 17 |
| 6.1 | Vorbereitung der Reagenzien und Hinweise | 17 |
| 6.2 | Probenvorbereitung – Azylierung | 17 |
| 6.3 | Serotonin ELISA | 18 |
| 7. | Berechnung der Ergebnisse | 18 |
| 7.1 | Erwartete Referenzbereiche | 18 |
| 7.2 | Typische Standardkurve | 19 |
| 8. | Kontrollproben | 19 |
| 9. | Assaycharakteristika | 19 |
| 9.1 | Leistungsdaten | 19 |
| 9.2 | Metrologische Rückführbarkeit | 21 |
| 10. | Referenzen/Literatur | 21 |
| 11. | Änderungen | 22 |

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of serotonin in urine and serum, to evaluate serotonin homeostasis. The determination of serotonin in urine is helpful for the determination of neurostress.

The quantitative determination of serotonin follows the basic principles of the enzyme immunoassay. In the first step, serotonin is quantitatively acylated. The subsequent competitive ELISA kit uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The acylated standards, controls and samples and the solid phase bound analyte compete for a fixed number of antiserum binding sites. After the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antiserum complexes are removed by washing. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate. The reaction is monitored at 450 nm. Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standard concentrations. Manual processing is recommended. The use of automatic laboratory equipment is the responsibility of the user. This in-vitro diagnostic is for professional use only.

1.2 Clinical application

Serotonin (5-hydroxytryptamine) is an intermediate product of tryptophan metabolism [2], a well-studied neurotransmitter, and may also act as a peripheral hormone [3]. Synthesis occurs mainly in enterochromaffin cells (ec-cells) of the gastrointestinal tract and in neurons [2, 4]. It is present in high concentrations in ec-cells of the intestine, serotonergic neurons of the brain, and platelets [1, 2, 4 – 6]. Serotonin is mainly degraded to 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) or melatonin [2, 7] and can be excreted in the urine [8]. In the bloodstream, the vast majority of serotonin is found in platelets [9] and can be readily detected in serum. Altered serotonin levels in serum and/or urine can indicate both physical and psychological dysfunction.

Serotonin balance may be impaired in serum and/or urine in a variety of conditions. For example, decreased serotonin levels have been demonstrated in depression, anxiety, and even pain sensitivity compared to unaffected subjects [6, 8, 10]. Increased serotonin levels, on the other hand, have been reported in patients with serotonin-secreting neuroendocrine tumors, also called carcinoid tumors [3, 12, 13], or hepatocellular carcinomas [14].

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 Procedural cautions, 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 must 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) must be followed.
- (4) To reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) If serious incidents should occur in connection with this product, they should be reported to the manufacturer and the competent national authorities.
- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 – 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided. Microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up.
- (8) Duplicate determination of sample is highly recommended.
- (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 for use at the appropriate time.

- (10) Incubation times do influence the results. All wells 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 provided with the kit.
- (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) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (16) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water.
- (17) For information about hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (18) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.
- (19) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (20) In case of any severe damage to the test kit or components, the manufacturer has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components must not be used for a test run. They must be stored properly until the manufacturer decides what to do with them. If it is decided that they are no longer suitable for measurements, they must be disposed of in accordance with national regulations.
- (21) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but must be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.

2.2 Limitations

Any inappropriate handling of samples or modification of this test might influence the results. If you have any further questions, please contact the manufacturer.

2.2.1 Interfering substances and proper handling of specimens

Urine

Please note the sample collection! It cannot be excluded that high acid concentrations lead to incorrect results. Up to 30 µl 100% acetic acid per 1 ml urine no influence on the results was observed.

Serum

Samples containing precipitates or fibrin strands might cause inaccurate results.

Hemolytic samples (up to 2 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 50 mg/dl bilirubin) and lipemic samples (up to 834 mg/dl triglycerides) have no influence on the assay results.

If the concentrations cannot be estimated and there are doubts as to whether the above limit values for hemolytic, icteric or lipemic samples are complied with, the samples should not be used in the assay.

2.2.2 Drug and food interferences

The following foods and stimulants can affect the serotonin content in the sample. Alcohol, pineapple, eggplant, avocados, bananas, grapefruit, currants, cocoa, kiwis, caffeine, melons, mirabelles, nicotine, pecans, peaches, plums, chocolate, gooseberries, tomatoes, walnuts.

Some drugs can also affect serotonin levels in the sample. For example, taking amphetamines, acetanilide, coumarins, ephedrine, guaifenesin, mephensin (carbamate), methocarbamol, monoamine oxidase inhibitors (MAO inhibitors), acetaminophen, phenacetin, phenobarbital, phentolamine, or reserpine can lead to increased serotonin levels. In contrast, acetylsalicylic acid, chlorpromazine, isoniazid, levodopa, methenamine, methyldopa, promethazine, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), or streptozocin may result in decreased serotonin levels.

Therefore, 2 – 4 days prior to specimen collection, these foods should be avoided and the medications discontinued if medically justifiable.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

Store kit and 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 2 months when stored at 2 – 8 °C.

Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly again including the desiccant.

4. Materials

4.1 Contents of the kit

| | | |
|-------------------------|---|---|
| BA E-0030 | WASH-CONC 50x | Wash Buffer Concentrate – concentrated 50x |
| Content: | Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH | |
| Volume: | 1 x 20 ml/vial, purple cap | |
| BA E-0040 | CONJUGATE | Antibody Conjugate – ready to use |
| Content: | Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase | |
| Volume: | 1 x 12 ml/vial | |
| Description: | Species is goat, red cap | |
| BA E-0055 | SUBSTRATE | Substrate – ready to use |
| Content: | Chromogenic substrate containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide | |
| Volume: | 1 x 12 ml/vial, black cap | |
| BA E-0080 | STOP-SOLN | Stop Solution – ready to use |
| Content: | 0.25 M sulfuric acid | |
| Volume: | 1 x 12 ml/vial, grey cap | |
| Hazards identification: |  | H290 May be corrosive to metals. |
| BA E-0931 | W SER 5-HIAA | Serotonin Microtiter Strips – ready to use |
| Content: | 1 x 96 well (12x8) antibody precoated microwell plate in a resealable white pouch with desiccant | |
| BA E-6612 | ACYL-REAG | Acylation Reagent – ready to use |
| Content: | Acylation reagent in DMSO | |
| Volume: | 2 x 3 ml/vial, white cap | |
| BA E-8910 | SER-AS | Serotonin Antiserum – ready to use |
| Content: | Rabbit anti-Serotonin antibody, blue coloured | |
| Volume: | 1 x 6 ml/vial, blue cap | |
| Description: | Species is rabbit | |
| BA E-8911 | ACYL-BUFF | Acylation Buffer – ready to use |
| Content: | TRIS buffer with non-mercury preservative | |
| Volume: | 1 x 55 ml/vial, grey cap | |

4.2 Calibration and Controls

Standards and Controls – ready to use

| Cat. no. | Component | Colour/Cap | Concentration [ng/ml] (=µg/l) | Concentration [nmol/l] | Volume/Vial |
|------------------|-------------------|------------|---|------------------------|-------------|
| BA R-8901 | STANDARD A | white | 0 | 0 | 4 ml |
| BA R-8902 | STANDARD B | yellow | 15 | 85 | 4 ml |
| BA R-8903 | STANDARD C | orange | 50 | 284 | 4 ml |
| BA R-8904 | STANDARD D | blue | 150 | 851 | 4 ml |
| BA R-8905 | STANDARD E | grey | 500 | 2,840 | 4 ml |
| BA R-8906 | STANDARD F | black | 2,500 | 14,175 | 4 ml |
| BA R-8951 | CONTROL 1 | green | Refer to QC-Report for expected value and acceptable range! | | 4 ml |
| BA R-8952 | CONTROL 2 | red | | | 4 ml |

Conversion: serotonin [ng/ml] x 5.67 = serotonin [nmol/l]

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

4.3 Additional materials required but not provided in the kit

- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Absorbent material (paper towel)
- Reaction tubes, at least 3 ml, Polypropylene/Polystyrol

4.4 Additional equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 20 – 500 µl
- Microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 – 650 nm
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Vortex mixer

5. Sample collection and storage

Serum

Collect blood by venipuncture, allow to clot, and separate serum by centrifugation according to manufacturer's instructions at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time. Serum serotonin levels may fluctuate throughout the day. Therefore, the blood sample should always be taken at the same time of day. Traumatic vascular access can drastically increase serotonin levels.

When in doubt, it is recommended that hemolytic, icteric, and lipemic samples not be used in the assay (see 2.2.1).

Storage: up to 1 day at 18 – 25 °C; up to 3 days at 2 – 8 °C; storage for a longer period (up to 6 months) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

Always store samples protected from light.

Urine

24-hour urine samples as well as spontaneous urine (second morning urine) can be used for analysis.

24-hour urine: Over a defined period of 24 hours, all urine is collected in a bottle with acid (10 – 15 ml 100% acetic acid) provided for stabilization and the total volume is noted for evaluation of the results. During the collection period, the collected sample must always be stored in a cool place protected from light (2 – 8 °C).

Spontaneous urine (second morning urine): stabilized with 10 µl 100% acetic acid per 1 ml of urine sample can be used. Always store samples protected from light. A creatinine determination for normalization is required.

When stabilizing urine, consider the acidity (see 2.2.1).

Storage: up to 1 day at 18 – 25 °C; up to 3 days at 2 – 8 °C; storage for a longer period (up to 6 months) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

6. Test procedure

Allow all reagents and samples to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Number the reaction tubes and microwell plates (microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up). Duplicate determinations are recommended.

The binding of the antisera and of the enzyme conjugate and the activity of the enzyme are temperature dependent. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. Varying incubation times will have similar influences on the absorbance. The optimal temperature during the enzyme immunoassay is between 20 – 25 °C.

⚠ *The use of a microtiter plate shaker with the following specifications is mandatory: shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm. Shaking with differing settings might influence the results.*

⚠ *Do not exceed the temperature during the enzyme immunoassay of 20 – 25 °C and the prescribed incubation times. Too high temperature during the enzyme immunoassay and too long incubation times might influence the results.*

⚠ *Carry out the washing steps thoroughly! Poor washing might influence the results.*

6.1 Preparation of reagents and further notes

Wash Buffer

Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate **WASH-CONC 50x** with water to a final volume of 1000 ml.
Storage: 2 months at 2 – 8 °C

Serotonin Microtiter Strips

In rare cases residues of the blocking and stabilizing reagent can be seen in the wells as small, white dots or lines. These residues do not influence the quality of the product.

Acylation Reagent

The Acylation Reagent (BA E-6612) has a freezing point of 18.5 °C. To ensure that the Acylation Reagent is liquid when being used, it must be ensured that the Acylation Reagent has reached room temperature and forms a homogeneous, crystal-free solution before being used.

If more than 3 ml are needed, pool the contents of the individual vials **ACYL-REAG** and mix thoroughly.

6.2 Preparation of samples – Acylation

| |
|--|
| 1. Pipette 20 µl of the standards, controls, and samples into the respective reaction tubes. |
| 2. Add 500 µl ACYL-BUFF to all tubes. |
| 3. Add 50 µl of ACYL-REAG to all tubes. |
| 4. Mix the reaction tubes thoroughly (vortex) and incubate for 15 min at RT (20 – 25 °C). |
| 5. Add 500 µl water to all tubes and mix thoroughly (vortex). |
| ⚠ Take 20 µl of the acylated standards, controls, and samples for the Serotonin ELISA . |

6.3 Serotonin ELISA

| |
|---|
| 1. Pipette 20 µl of the acylated standards, controls, and samples into the appropriate wells of the SER 5-HIAA . |
| 2. Pipette 50 µl of the SER-AS into all wells. |
| 3. Incubate 60 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). |
| 4. Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate 4 times by adding 300 µl of Wash Buffer, discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material. |
| 5. Pipette 100 µl of the CONJUGATE into each well. |
| 6. Incubate for 30 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). |
| 7. Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate 4 times by adding 300 µl of Wash Buffer, discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material. |
| 8. Pipette 100 µl of the SUBSTRATE into each well. |
| 9. Incubate for 25 ± 5 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm). ⚠ Avoid exposure to direct sunlight! |
| 10. Add 100 µl of the STOP-SOLN to all wells and shake the microtiter plate shortly. |
| 11. Read the absorbance of the solution in the wells within 10 min, using a microtiter plate reader set to 450 nm (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended). |

7. Calculation of results

| Measuring range | Serotonin | |
|-----------------|-----------|-----------------|
| | Serum | 8 – 2,170 ng/ml |
| | Urine | 8 – 2,027 ng/ml |

The standard curve is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis) using a concentration of 0.001 ng/ml for Standard A (this alignment is mandatory because of the logarithmic presentation of the data).

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

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

The concentrations of the samples and controls can be read directly from the standard curve.

Samples found with concentrations higher than the highest standard (Standard F) should be diluted accordingly with Standard A and must be re-assayed.

The total amount of **Serotonin** excreted in urine during 24h is calculated as following:

$$\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$$

The amount of **Serotonin** normalized to creatinine is calculated as following:

$$\mu\text{g}/\text{g creatinine} = \text{ng}/\text{ml (serotonin)} / \text{creatinine (mg}/\text{dl)} \times 100$$

Conversion

$$\text{Serotonin [ng/ml]} \times 5.67 = \text{serotonin [nmol/l]}$$

7.1 Expected reference value

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

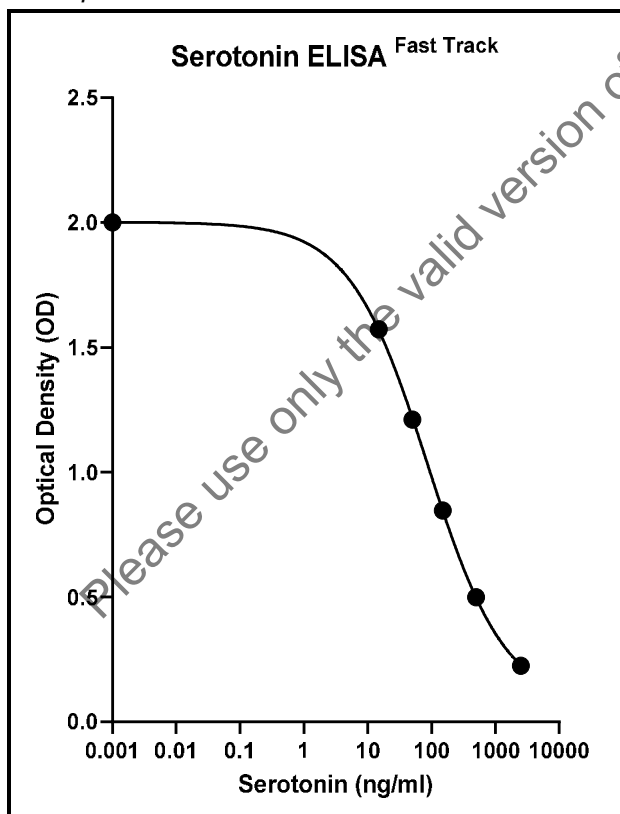
As a basis for the internal reference range determination, the following number of samples for the respective parameters was considered: 24-hour urine n = 194, spontaneous urine (second morning urine) n = 81, serum n = 80. Expected reference ranges were determined in an internal study by testing samples from an apparently healthy European population (95% reference interval).

| | Serotonin |
|--|--|
| Reference range 24-hour urine | 9 – 193 $\mu\text{g}/24\text{h}$ 24 – 124 $\mu\text{g}/\text{g creatinine}$ |
| Reference range Spontaneous urine (Second morning urine) | 30 – 129 $\mu\text{g}/\text{g creatinine}$ |
| Reference range serum | 20 – 206 ng/ml |

Values significantly outside the reference range should be assessed by a doctor.

7.2 Typical standard curve

⚠ Example do not use for calculation!



8. Quality control

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. Commercially obtained control samples should be treated like unknown samples.

Control samples should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are printed on the QC-Report.

9. Assay characteristics

9.1 Performance data

Analytical Sensitivity was determined according to the CLSI Standard EP17-A2 Vol. 32 No. 8.

For the determination of the analytical sensitivity, 5 blank samples and 5 low level samples in 2 kit lots in 4 replicates per sample were determined. This resulted in 60 results blank and 60 results low level per lot.

| Analytical Sensitivity | Serotonin |
|-------------------------------|-----------|
| Limit of Blank (LOB) | 2.9 ng/ml |
| Limit of Detection (LOD) | 5.9 ng/ml |
| Limit of Quantification (LOQ) | 8.0 ng/ml |

| Analytical Specificity (Cross Reactivity) | |
|---|----------------------|
| Substance | Cross Reactivity (%) |
| Tryptamine | 0.171 |
| Melatonin | < 0.1 |
| 5-Hydroxyindole acetic acid | < 0.1 |
| Phenylalanine | < 0.1 |
| Histidine | < 0.1 |
| Tyramine | < 0.1 |
| 5-Hydroxytryptophan | < 0.1 |

The method comparison was conducted according to the CLSI standard CLSI EP09c 3rd ed.

| Method comparison ELISA vs. XLC-MS/MS | Serum | $y = 0.99x - 9.2; r^2 = 0.996; n = 100$ |
|--|-------|---|
| | Urine | $y = 0.9x - 20.7; r^2 = 0.988; n = 97$ |

The precision of the intra- and inter-assay variation was investigated by determining the concentration of 6 serum samples and 6 urine samples in two runs per day in each 2 replicates over 20 days (according to the CLSI standard EP05-A3 Vol. 34 No.13).

| Precision | | | | | |
|-------------|-------------------|--------|-------------|-------------------|--------|
| Intra-Assay | | | Inter-Assay | | |
| Serum | | | Serum | | |
| Sample | Mean ± SD [ng/ml] | CV [%] | Sample | Mean ± SD [ng/ml] | CV [%] |
| 1 | 11.8 ± 2.1 | 17.6 | 1 | 11.8 ± 3.3 | 28.2 |
| 2 | 61.6 ± 5.2 | 8.4 | 2 | 61.6 ± 7.7 | 12.5 |
| 3 | 102 ± 8.6 | 8.5 | 3 | 102 ± 12.3 | 12.1 |
| 4 | 227 ± 15.5 | 6.8 | 4 | 227 ± 23.0 | 10.1 |
| 5 | 493 ± 25.2 | 5.1 | 5 | 493 ± 55.7 | 11.3 |
| 6 | 1,792 ± 109 | 6.1 | 6 | 1,792 ± 165 | 9.2 |
| Urine | | | Urine | | |
| Sample | Mean ± SD [ng/ml] | CV [%] | Sample | Mean ± SD [ng/ml] | CV [%] |
| 1 | 18.1 ± 2.0 | 11.3 | 1 | 18.1 ± 4.0 | 22.2 |
| 2 | 55.2 ± 4.0 | 7.3 | 2 | 55.2 ± 6.4 | 11.7 |
| 3 | 153 ± 9.1 | 5.9 | 3 | 153 ± 14.6 | 9.5 |
| 4 | 240 ± 11.4 | 4.8 | 4 | 240 ± 21.9 | 9.1 |
| 5 | 498 ± 29.3 | 5.9 | 5 | 498 ± 44.5 | 8.9 |
| 6 | 1,798 ± 120 | 6.7 | 6 | 1,798 ± 221 | 12.3 |

Recovery was determined according to the CLSI standard EP 34 1st ed.

| Recovery | | | |
|----------|---------------|----------|-----------|
| | Range [ng/ml] | Mean [%] | Range [%] |
| Serum | 49.4 – 1,046 | 98 | 84 – 112 |
| Urine | 10.0 – 1,023 | 91 | 82 – 98 |

| Linearity of sample dilution | | | |
|-------------------------------------|-----------------------|----------|-----------|
| | Serial dilution up to | Mean [%] | Range [%] |
| Serum | 1:64 | 103 | 93 – 113 |
| Urine | 1:64 | 98 | 88 – 111 |

The linearity within the measuring range was determined according to the CLSI standard CLSI EP06-Ed2. The linearity is given if the determined value does not deviate by more than 20% from the forecast value.

| Linear range | |
|---------------------|------------------|
| Serum | 18 – 2,170 ng/ml |
| Urine | 20 – 2,027 ng/ml |

| Lot-to-Lot | | | |
|----------------------------|--------|-------------------|--------|
| | Sample | Mean ± SD [ng/ml] | CV [%] |
| Serotonin in urine (n = 3) | 1 | 118 ± 8.5 | 7.2 |
| | 2 | 549 ± 47.3 | 8.6 |
| Serotonin in serum (n = 3) | 1 | 90.3 ± 2.0 | 2.2 |
| | 2 | 755 ± 52.2 | 6.9 |

9.2 Metrological Traceability

The values assigned to the standards and controls of the Serotonin ELISA ^{Fast Track} are traceable to SI Units by calibrated weighing with quality-controlled analyte.

| Standards und Controls | Uncertainty [%] |
|-------------------------------|-----------------|
| | 1.2% |

| Serotonin ELISA ^{Fast Track} | | |
|--|-----------------------|---------------------------------|
| | Concentration [ng/ml] | Expanded Uncertainty [%] k = 2* |
| Serum | 61.6 | 25.1 |
| | 227 | 20.3 |
| Urine | 18.1 | 44.5 |
| | 55.2 | 23.5 |
| | 153 | 19.2 |
| | 240 | 18.4 |
| | 498 | 18.0 |
| | 1,798 | 24.7 |

* This defines an interval about the measured result that will include the true value with a probability of 95%.

10. References/Literature

- Bieger, W.P., NeuroStress Guide. 2011.
- Chojnacki, C., et al., Evaluation of serotonin and dopamine secretion and metabolism in patients with irritable bowel syndrome. Pol Arch Intern Med, 2018. 128(11): p. 711 – 713.
- Huang, H., Z. Chen, and X. Yan, Simultaneous determination of serotonin and creatinine in urine by combining two ultrasound-assisted emulsification microextractions with on-column stacking in capillary electrophoresis. J Sep Sci, 2012. 35(3): p. 436 – 44.
- Piešťanský, J., K. Maráková, and P. Mikuš, Two-Dimensional Capillary Electrophoresis with On-Line Sample Preparation and Cyclodextrin Separation Environment for Direct Determination of Serotonin in Human Urine. Molecules, 2017. 22(10).
- Lindström, M., et al., Comparison of serum serotonin and serum 5-HIAA LC-MS/MS assays in the diagnosis of serotonin producing neuroendocrine neoplasms: A pilot study. Clin Chim Acta, 2018. 482: p. 78 – 83.
- Ren, C., et al., Low levels of serum serotonin and amino acids identified in migraine patients. Biochem Biophys Res Commun, 2018. 496(2): p. 267 – 273.
- Moriarty, M., et al., Development of an LC-MS/MS method for the analysis of serotonin and related compounds in urine and the identification of a potential biomarker for attention deficit hyperactivity/hyperkinetic disorder. Anal Bioanal Chem, 2011. 401(8): p. 2481 – 93.














8. Nichkova, M.I., et al., Evaluation of a novel ELISA for serotonin: urinary serotonin as a potential biomarker for depression. Anal Bioanal Chem, 2012. 402(4): p. 1593 – 600.
9. Holck, A., et al., Plasma serotonin levels are associated with antidepressant response to SSRIs. J Affect Disord, 2019. 250: p. 65 – 70.
10. Jaworek, A.K., et al., Depression and Serum Content of Serotonin in Adult Patients with Atopic Dermatitis. Adv Exp Med Biol, 2020. 1271: p. 83 – 88.
11. Shu, B., et al., Serotonin and YAP/VGLL4 Balance Correlated with Progression and Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 9739.
12. Mahato, K., et al., Novel electrochemical biosensor for serotonin detection based on gold nanorattles decorated reduced graphene oxide in biological fluids and in vitro model. Biosens Bioelectron, 2019. 142: p. 111502.
13. Yu, R., High Serum Serotonin Test Results Caused by Traumatic Vascular Access Due to Difficult Veins. Pancreas, 2019. 48(6): p. e51 – e53.
14. Mamdouh, F., et al., Serum Serotonin as a Potential Diagnostic Marker for Hepatocellular Carcinoma. J Interferon Cytokine Res, 2019. 39(12): p. 780 – 785.

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

11. Changes

| Version | Release Date | Chapter | Change |
|---------|--------------|---------|--|
| 17.1 | 2022-06-14 | All | Assay Revision due to IVDR regulation (EU) 2017/746. Due to this revision all chapters were revised and changed. |
| 18.0 | 2023-03-20 | 7.1 | Sentence: "Values significantly outside the reference range should be assessed by a doctor." added |

Symbols:

| | | | | | |
|---|------------------------------|---|------------------|---|-----------------------------------|
|  | Storage temperature |  | Manufacturer |  | Contains sufficient for <n> tests |
|  | Use-by date |  | Batch code |  | For in-vitro diagnostic use only! |
|  | Consult instructions for use |  | Content |  | CE marking of conformity |
|  | Caution |  | Catalogue number |  | Distributor |
|  | Date of manufacture | | | | |

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Serotonin in Urin und Serum, um das Serotoningleichgewicht zu beurteilen. Die Bestimmung von Serotonin in Urin hilft u. a. bei der Beurteilung von Neurostress.

Die Bestimmung des Serotonins folgt den grundlegenden Prinzipien eines Enzymimmunoassays.

Im Verlauf der Probenvorbereitung wird das Serotonin zu einem N-Acyl-Derivat modifiziert.

Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an die feste Phase gebunden. Die acylierten Standards, Kontrollen und Proben und die an die Festphase gebundenen Antigene konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörper Komplexe durch Waschen entfernt. Der an der festen Phase gebundene Antigen-Antikörper Komplex wird mit einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen Antikörper gebunden und mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen.

Die Konzentrationen der unbekannt Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve und Abgleich der gemessenen Absorption ermittelt. Die manuelle Bearbeitung wird empfohlen. Die Verwendung von automatischen Laborgeräten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Dieses In-Vitro-Diagnostikum ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

1.2 Klinische Anwendung

Serotonin (5-Hydroxytryptamin) ist ein Intermediärprodukt des Tryptophanstoffwechsels [2], ein gut untersuchter Neurotransmitter und kann auch als peripheres Hormon wirken [3]. Die Synthese findet hauptsächlich in den enterochromaffinen Zellen (EC-Zellen) des Gastrointestinaltraktes und in Neuronen statt [2, 4]. In hohen Konzentrationen liegt es in den EC-Zellen des Darms, den serotonergen Neuronen des Gehirns und in Thrombozyten vor [1, 2, 4 – 6]. Serotonin wird hauptsächlich zu 5-Hydroxyindol-Essigsäure (5-HIAA) oder Melatonin abgebaut [2, 7] und kann über den Urin ausgeschieden werden [8]. Im Blutkreislauf befindet sich der weitaus größte Teil des Serotonins in den Blutplättchen [9] und lässt sich gut im Serum nachweisen [2, 10, 11]. Veränderte Serotoninspiegel im Serum und/oder Urin können sowohl auf physischen als auch psychischen Dysfunktionen hinweisen.

Das Serotonin-Gleichgewicht kann bei unterschiedlichen Beschwerden im Serum und/oder im Urin beeinträchtigt sein. So wurden z.B. bei Depressionen, Angstzuständen oder auch Schmerzempfindlichkeit verringerte Serotoninlevel im Vergleich zu nicht betroffenen Probanden nachgewiesen [6, 8, 10]. Stark erhöhte Serotoninlevel hingegen wurden bei Patienten mit Serotonin-sekretierenden neuroendokrinen Tumoren, auch Karzinoidtumore genannt [3, 12, 13], oder Leberzellkarzinomen berichtet [14].

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 professionellen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Gebrauchsanweisung 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) Geeignete persönliche Schutzausrüstung (Kittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille) ist zu tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Falls in Zusammenhang mit diesem Produkt schwerwiegende Vorfälle auftreten sollten, sollen diese dem Hersteller und den zuständigen nationalen Behörden gemeldet werden.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Verwenden Sie für Verdünnungs- oder

Rekonstitutionszwecke deionisiertes, destilliertes oder ultrareines Wasser. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.

- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über einzeln herausnehmbare und abbrechbare Streifen. Ungenutzte Wells müssen bei 2 – 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden. Die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden.
- (8) Proben sollten in Doppelbestimmung gemessen werden.
- (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 Wells 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 der Kitkontrollen 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) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (16) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (17) 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.
- (18) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potentiell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
- (19) Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (20) Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen sachgerecht gelagert werden, bis der Hersteller entscheidet, wie mit ihnen zu verfahren ist. Sollte entschieden werden, dass sie für Messungen nicht mehr geeignet sind, müssen sie entsprechend den nationalen Richtlinien entsorgt werden.
- (21) 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.

2.2 Grenzen des Tests

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

Bei weiteren Fragen hierzu, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

2.2.1 Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben

Urin

Probenbehandlung genau beachten! Es ist nicht auszuschließen, dass ein zu hoher Säuregehalt zu falschen Ergebnissen führen kann. Bis zu 30 µl 100% Essigsäure pro 1 ml Urin wurde kein Einfluss auf die Ergebnisse beobachtet.

Serum

Proben, die ein Präzipitat oder die Fibrinfäden enthalten, können zu ungenauen Ergebnissen führen. Hämolytische Proben (bis zu 2 mg/ml Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 50 mg/dl Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 834 mg/dl Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse. Sollten die Konzentrationen nicht abzuschätzen sein und Zweifel bestehen, ob die oben genannten Grenzwerte für hämolytische, ikterische oder lipämische Proben eingehalten werden, sollten die Proben nicht im Assay eingesetzt werden.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel

Folgende Nahrungs- und Genussmittel können den Serotoningehalt in der Probe beeinflussen. Alkohol, Ananas, Auberginen, Avocados, Bananen, Grapefruit, Johannisbeeren, Kakao, Kiwis, Koffein, Melonen, Mirabellen, Nikotin, Pecannüsse, Pflirsiche, Pflaumen, Schokolade, Stachelbeeren, Tomaten, Walnüsse. Auch einige Medikamente können den Serotoninspiegel in der Probe beeinflussen. So kann die Einnahme von Amphetaminen, Azetanilid, Cumarine, Ephidrin, Guaifenesin, Mephenesin (carbamate), Methocarbamol, Monoaminoxidase-Hemmer (MAO-Hemmer), Paracetamol, Phenacetin, Phenobarbital, Phentolamin oder Reserpin zu erhöhten Serotoninwerten führen. Acetylsalicylsäure, Chlorpromazin, Isoniazid, Levodopa, Methenamin, Methyldopa, Promethazin, selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRIs) oder Streptozocin hingegen können zu verringerten Serotoninwerten führen.

2 – 4 Tage vor Probenentnahme sollte daher auf den Verzehr dieser Nahrungsmittel verzichtet werden und die Medikamente, wenn medizinisch vertretbar, abgesetzt werden.

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Assay nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Das Kit muss bei 2 – 8 °C gelagert werden. Das Kit und die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfalldatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 2 Monate stabil, wenn sie bei 2 – 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

| | | |
|-------------------|---|---|
| BA E-0030 | WASH-CONC 50x | Waschpufferkonzentrat – 50x konzentriert |
| Inhalt: | Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH | |
| Volumen: | 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel lila | |
| BA E-0040 | CONJUGATE | Enzymkonjugat – gebrauchsfertig |
| Inhalt: | Ziege anti-Kaninchen Immunglobuline, konjugiert mit Peroxidase | |
| Volumen: | 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot | |
| Beschreibung: | Spezies ist Ziege | |
| BA E-0055 | SUBSTRATE | Substrat – gebrauchsfertig |
| Inhalt: | Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid | |
| Volumen: | 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz | |
| BA E-0080 | STOP-SOLN | Stopplösung – gebrauchsfertig |
| Inhalt: | 0,25 M Schwefelsäure | |
| Volumen: | 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel grau | |
| Gefahrenhinweise: |  H290 kann gegenüber Metallen korrosiv sein. | |
| BA E-0931 | SER 5-HIAA | Serotonin Mikrotiterstreifen – gebrauchsfertig |
| Inhalt: | 1 x 96 Well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem weißen wiederverschließbaren Beutel | |
| BA E-6612 | ACYL-REAG | Azylierungsreagenz – gebrauchsfertig |
| Inhalt: | Azylierungsreagenz in DMSO | |
| Volumen: | 2 x 3 ml/Fläschchen, Deckel weiß | |
| BA E-8910 | SER-AS | Serotonin Antiserum – gebrauchsfertig |
| Inhalt: | Kaninchen anti-Serotonin Antikörper, blau gefärbt | |
| Volumen: | 1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau | |
| Beschreibung: | Spezies ist Kaninchen | |

BA E-8911 **ACYL-BUFF** **Azylierungspuffer** – gebrauchsfertig

Inhalt: TRIS Puffer mit quecksilberfreien Konservierungsmitteln

Volumen: 1 x 55 ml/Fläschchen, Deckel grau

4.2 Kalibratoren und Kontrollen**Standards and Kontrollen** – gebrauchsfertig

| Artikelnr. | Komponente | Deckelfarbe | Konzentration [ng/ml] (= µg/l) | Konzentration nmol/l | Volumen/ Fläschchen |
|------------|------------|-------------|---|-------------------------|------------------------|
| BA R-8901 | STANDARD A | weiß | 0 | 0 | 4 ml |
| BA R-8902 | STANDARD B | gelb | 15 | 85 | 4 ml |
| BA R-8903 | STANDARD C | orange | 50 | 284 | 4 ml |
| BA R-8904 | STANDARD D | blau | 150 | 851 | 4 ml |
| BA R-8905 | STANDARD E | grau | 500 | 2.840 | 4 ml |
| BA R-8906 | STANDARD F | schwarz | 2.500 | 14.175 | 4 ml |
| BA R-8951 | CONTROL 1 | grün | Die zu erwartenden Konzentrationen und | | 4 ml |
| BA R-8952 | CONTROL 2 | rot | Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben | | 4 ml |

Umrechnung: Serotonin [ng/ml] x 5.67 = Serotonin [nmol/l]

Inhalt: TRIS Puffer mit quecksilberfreien Konservierungsmitteln, aufgestockt mit einer definierten Menge Serotonin

4.3 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien

- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage
- Reaktionsröhrchen, Mindestvolumen 3 ml, Polypropylen/Polystyrol

4.4 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 20 – 500 µl
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer mit 450 nm und, wenn möglich, 620 – 650 nm Filter zur Auswertung von Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplattenschüttler (Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm)
- Vortex-Mischer

5. Probenbehandlung und Lagerung**Serum**

Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation (nach Angaben des Herstellers) abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern. Der Serumserotoninspiegel kann im Tagesverlauf schwanken. Es sollte daher immer am gleichen Tageszeitpunkt die Blutabnahme erfolgen.

Ein traumatischer Gefäßzugang kann die Serotoninwerte drastisch erhöhen.

Es wird im Zweifel empfohlen, hämolytische, ikterische und lipämische Proben nicht im Assay einzusetzen (siehe 2.2.1).

Lagerung: bis zu 1 Tag bei 18 – 25 °C; bis zu 3 Tage bei 2 – 8 °C; für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Proben immer lichtgeschützt lagern.

Urin

24-Stunden Urinproben sowie Spontanurin (zweiter Morgenurin) können zur Analyse verwendet werden. 24-Stunden Urin: über einen definierten Zeitraum von 24 Stunden wird sämtlicher Urin in einem Gefäß mit vorgelegter Säure (10 – 15 ml 100% Essigsäure) zur Stabilisierung gesammelt und das Gesamtvolumen für die spätere Auswertung der Ergebnisse notiert. Während der Sammelperiode ist das gesammelte Probenmaterial stets kühl und lichtgeschützt zu lagern (2 – 8 °C).

Spontaner Urin (zweiter Morgenurin): stabilisiert mit 10 µl 100% Essigsäure pro 1 ml Urinprobe, kann verwendet werden. Proben immer lichtgeschützt lagern. Eine Kreatinbestimmung zur Normalisierung ist erforderlich.

Bei der Stabilisierung von Urin auf Säuregehalt achten (siehe 2.2.1).

Lagerung: bis zu 1 Tag bei 18 – 25 °C; bis zu 3 Tage bei 2 – 8 °C; für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Nummerieren Sie die Reaktionsröhrchen und die Mikrotiterplatten (Mikrotiterstreifen, die zur Verwendung aus dem Rahmen entfernt werden, sollten entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden). Doppelbestimmungen werden empfohlen.

Die Reaktion des Antikörpers, des Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassays liegt zwischen 20 – 25 °C.

⚠ Der verwendete Mikrotiterplattenschüttler muss folgende Spezifikationen haben: Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm. Schütteln mit abweichenden Einstellungen kann die Ergebnisse beeinflussen.

⚠ Die Temperatur während des Enzymimmunoassays von 20 – 25 °C und die vorgeschriebenen Inkubationszeiten nicht überschreiten. Zu hohe Temperatur während des Ansatzes und zu lange Inkubationszeiten können die Ergebnisse beeinflussen.

⚠ Die Waschschritte sorgfältig durchführen! Mangelhaftes Waschen kann die Ergebnisse negativ beeinflussen.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien und Hinweise

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC** **50x** mit Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

Serotonin Mikrotiterstreifen

Vereinzelt können Rückstände der Blockier- und Stabilisierlösung in den Wells zu sehen sein (kleine weiße Punkte oder Linien). Diese stellen keine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes dar.

Azylierungsreagenz

Das **ACYL-REAG** (BA E-6612) hat einen Gefrierpunkt von 18,5 °C. Um sicher zu stellen, dass es bei Gebrauch flüssig ist, muss es vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden und danach eine homogene, kristallfreie Lösung bilden.

Falls mehr als 3 ml benötigt werden, die Inhalte der einzelnen Fläschchen **ACYL-REAG** zusammenführen und gut mischen.

6.2 Probenvorbereitung – Azylierung

| | |
|----|--|
| 1. | Jeweils 20 µl der Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Reaktionsröhrchen pipettieren. |
| 2. | Je 500 µl ACYL-BUFF in alle Reaktionsröhrchen pipettieren. |
| 3. | Je 50 µl ACYL-REAG in alle Reaktionsröhrchen pipettieren. |
| 4. | Die Reaktionsröhrchen sorgfältig mischen (Vortex) und 15 min bei RT (20 – 25 °C) inkubieren. |
| 5. | Je 500 µl Wasser in alle Reaktionsröhrchen hinzufügen und sorgfältig mischen (Vortex). |
| ⚠ | Jeweils 20 µl der azylierten Standards, Kontrollen und Proben werden für den nachfolgenden Serotonin ELISA benötigt. |

6.3 Serotonin ELISA

| | |
|-----|--|
| 1. | Jeweils 20 µl der azylierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells der W SER 5-HIAA pipettieren. |
| 2. | Jeweils 50 µl SER-AS in alle Wells pipettieren. |
| 3. | Platte 60 min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. |
| 4. | Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells 4-mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. |
| 5. | Jeweils 100 µl CONJUGATE in alle Wells pipettieren. |
| 6. | Für 30 min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. |
| 7. | Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells 4-mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. |
| 8. | Jeweils 100 µl SUBSTRATE in alle Wells pipettieren |
| 9. | Für 25 ± 5 min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. ⚠ Direktes Sonnenlicht vermeiden! |
| 10. | 100 µl STOP-SOLN in alle Wells pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln. |
| 11. | Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge zwischen 620 und 650 nm) innerhalb von 10 min messen . |

7. Berechnung der Ergebnisse

| Messbereich | Serotonin | |
|-------------|-----------------|-----------------|
| | Serum | 8 – 2.170 ng/ml |
| Urin | 8 – 2.027 ng/ml | |

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntenen Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Extinktionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) erstellt mit einer Konzentration von 0,001 ng/ml für Standard A (diese Ausrichtung ist aufgrund der logarithmischen Darstellung der Daten erforderlich). Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z. B.: 4-parameter, marquardt) verwendet.

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

Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen können direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (Standard F) gefunden werden, müssen entsprechend mit Standard A verdünnt werden und nochmals bestimmt werden.

Die Gesamtmenge an **Serotonin**, die innerhalb von 24 Stunden im Urin ausgeschieden wird, wird wie folgt berechnet: $\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$

Die Menge an **Serotonin**, die zu Kreatinin normalisiert wird, wird wie folgt berechnet:

$\mu\text{g}/\text{g Kreatinin} = \text{ng}/\text{ml (Serotonin)} / \text{Kreatinin (mg}/\text{dl)} \times 100$

Umrechnung:

Serotonin [ng/ml] x 5,67 = Serotonin [nmol/l]

7.1 Erwartete Referenzbereiche

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

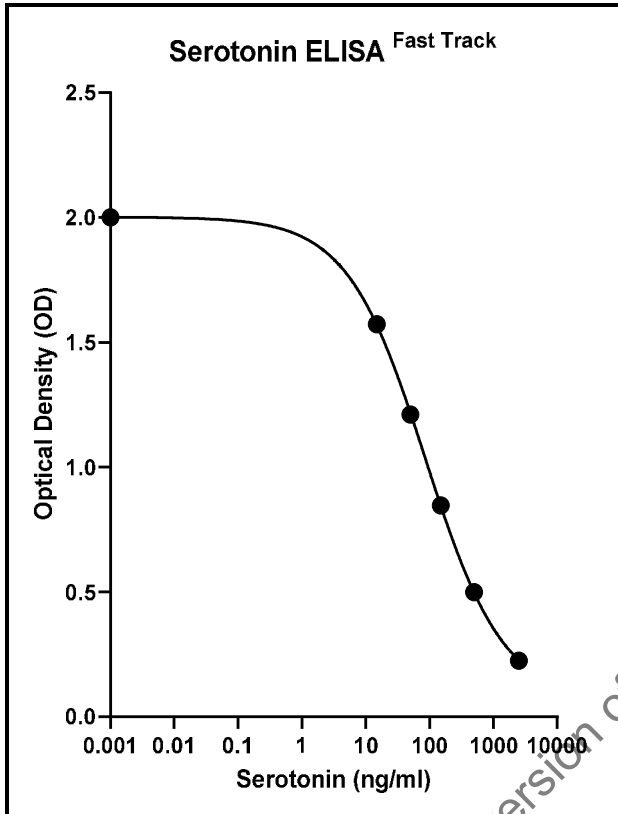
Als Grundlage für die interne Referenzbereichsbestimmung wurde folgende Probenanzahl für die jeweiligen Parameter berücksichtigt: 24h Sammelurin n = 194, Spontanurin (2. Morgenurin) n = 81, Serum n = 80. Die erwarteten Referenzbereiche wurden in einer internen Studie durch die Untersuchung von Proben aus einer offensichtlich gesunden europäischen Bevölkerung ermittelt (95% Referenzintervall).

| | Serotonin |
|---|---|
| Referenzbereich 24-Stunden Urin | 9 – 193 µg/24h 24 – 124 µg/g Kreatinin |
| Referenzbereich Spontanurin (2. Morgenurin) | 30 – 129 µg/g Kreatinin |
| Referenzbereich Serum | 20 – 206 ng/ml |

Deutlich außerhalb des Referenzbereichs liegende Werte sollen ärztlich bewertet werden.

7.2 Typische Standardkurve

⚠ *Beispiel: Bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



8. Kontrollproben

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. Kommerzielle Kontrollproben müssen dabei wie die unbekanntenen Proben behandelt werden. Die Kontrollproben müssen innerhalb der Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

9. Assaycharakteristika

9.1 Leistungsdaten

Die analytische Sensitivität wurde bestimmt nach dem CLSI Standard EP17-A2 Vol. 32 No. 8. Für die Bestimmung der Analytischen Sensitivität wurden 5 Blank Proben und 5 Low Level Proben in 2 Kit Lots in 4 Replikaten pro Probe bestimmt. Dies resultierte pro Lot in je 60 Ergebnisse Blank und 60 Ergebnisse Low Level.

| Analytische Sensitivität | Serotonin |
|---------------------------------|------------------|
| Limit of Blank (LOB) | 2,9 ng/ml |
| Limit of Detection (LOD) | 5,9 ng/ml |
| Limit of Quantification (LOQ) | 8,0 ng/ml |

| Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen) | |
|---|-----------------------------|
| Substanz | Kreuzreaktivität (%) |
| Tryptamin | 0,171 |
| Melatonin | < 0,1 |
| 5-Hydroxyindol-Essigsäure | < 0,1 |
| Phenylalanin | < 0,1 |
| Histidin | < 0,1 |
| Tyramin | < 0,1 |
| 5-Hydroxytryptophan | < 0,1 |

Der Methodenvergleich wurde nach dem CLSI Standard CLSI EP09c 3rd ed. durchgeführt und ausgewertet.

| Methodenvergleich ELISA vs. XLC-MS/MS | Serum | $y = 0,99x - 9,2; R^2 = 0,996; n = 100$ |
|--|-------|---|
| | Urin | $y = 0,9x - 20,7; R^2 = 0,988; n = 97$ |

Die Präzision der Intra- und Inter-Assay-Variation wurde ermittelt, indem die Konzentration von 6 Serumproben und 6 Urinproben in zwei Durchläufen pro Tag in jeweils 2 Replikaten über 20 Tage bestimmt wurde (nach CLSI Standard EP05-A3 Vol. 34 No.13).

| Präzision | | | | | |
|--------------------|-------------------------|--------|--------------------|-------------------------|--------|
| Intra-Assay | | | Inter-Assay | | |
| Serum | | | Serum | | |
| Probe | Mittelwert ± SD [ng/ml] | CV [%] | Probe | Mittelwert ± SD [ng/ml] | CV [%] |
| 1 | 11,8 ± 2,1 | 17,6 | 1 | 11,8 ± 3,3 | 28,2 |
| 2 | 61,6 ± 5,2 | 8,4 | 2 | 61,6 ± 7,7 | 12,5 |
| 3 | 102 ± 8,6 | 8,5 | 3 | 102 ± 12,3 | 12,1 |
| 4 | 227 ± 15,5 | 6,8 | 4 | 227 ± 23,0 | 10,1 |
| 5 | 493 ± 25,2 | 5,1 | 5 | 493 ± 55,7 | 11,3 |
| 6 | 1.792 ± 109 | 6,1 | 6 | 1.792 ± 165 | 9,2 |
| Urin | | | Urin | | |
| Probe | Mittelwert ± SD [ng/ml] | CV [%] | Probe | Mittelwert ± SD [ng/ml] | CV [%] |
| 1 | 18,1 ± 2,0 | 11,3 | 1 | 18,1 ± 4,0 | 22,2 |
| 2 | 55,2 ± 4,0 | 7,3 | 2 | 55,2 ± 6,4 | 11,7 |
| 3 | 153 ± 9,1 | 5,9 | 3 | 153 ± 14,6 | 9,5 |
| 4 | 240 ± 11,4 | 4,8 | 4 | 240 ± 21,9 | 9,1 |
| 5 | 498 ± 29,3 | 5,9 | 5 | 498 ± 44,5 | 8,9 |
| 6 | 1.798 ± 120 | 6,7 | 6 | 1.798 ± 221 | 12,3 |

Die Wiederfindung wurde bestimmt nach dem CLSI Standard EP 34 1st ed.

| Wiederfindung | | | |
|----------------------|-----------------|----------------|-------------|
| | Bereich [ng/ml] | Mittelwert [%] | Bereich [%] |
| Serum | 49,4 – 1.046 | 98 | 84 – 112 |
| Urin | 10,0 – 1.023 | 91 | 82 – 98 |

| Linearität der Probenverdünnung | | | |
|--|-------------------------|----------------|-------------|
| | Serielle Verdünnung bis | Mittelwert [%] | Bereich [%] |
| Serum | 1:64 | 103 | 93 – 113 |
| Urin | 1:64 | 98 | 88 – 111 |

Die Linearität innerhalb des Messbereichs wurde bestimmt nach dem CLSI Standard CLSI EP06-Ed2. Die Linearität ist gegeben, wenn der ermittelte Wert um nicht mehr als 20% vom Vorhersagewert abweicht.

| Linearer Bereich | |
|-------------------------|------------------|
| Serum | 18 – 2.170 ng/ml |
| Urin | 20 – 2.027 ng/ml |

| Lot-zu-Lot | | | |
|----------------------------|-------|----------------------------|--------|
| | Probe | Mittelwert ± SD [ng/ml] | CV [%] |
| Serotonin in Urin (n = 3) | 1 | 118 ± 8,5 | 7,2 |
| | 2 | 549 ± 47,3 | 8,6 |
| Serotonin in Serum (n = 3) | 1 | 90,3 ± 2,0 | 2,2 |
| | 2 | 755 ± 52,2 | 6,9 |

9.2 Metrologische Rückführbarkeit

Die Standards und Kontrollen des Serotonin ELISA ^{Fast Track} zugewiesenen Werte sind durch geeichte Wägung mit qualitätskontrollierten Analyten auf SI-Einheiten rückführbar.

| Standards und Kontrollen | Unsicherheit [%] |
|--------------------------|------------------|
| | 1,2 |

| Serotonin ELISA ^{Fast Track} | | |
|--|-----------------------|------------------------------------|
| | Konzentration [ng/ml] | Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2* |
| Serum | 61,6 | 25,1 |
| | 227 | 20,3 |
| | | |
| Urin | Konzentration [ng/ml] | Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2* |
| | 18,1 | 44,5 |
| | 55,2 | 23,5 |
| | 153 | 19,2 |
| | 240 | 18,4 |
| | 498 | 18,0 |
| | 1.798 | 24,7 |

* Das Intervall der maximalen erweiterten Unsicherheit ist der Bereich, in dem der wahre Messwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% um den gemessenen Wert liegt.

10. Referenzen/Literatur









1. Bieger, W.P., NeuroStress Guide. 2011.
2. Chojnacki, C., et al., Evaluation of serotonin and dopamine secretion and metabolism in patients with irritable bowel syndrome. Pol Arch Intern Med, 2018. 128(11): p. 711 – 713.
3. Huang, H., Z. Chen, and X. Yan, Simultaneous determination of serotonin and creatinine in urine by combining two ultrasound-assisted emulsification microextractions with on-column stacking in capillary electrophoresis. J Sep Sci, 2012. 35(3): p. 436 – 44.
4. Piešťanský, J., K. Maráková, and P. Mikuš, Two-Dimensional Capillary Electrophoresis with On-Line Sample Preparation and Cyclodextrin Separation Environment for Direct Determination of Serotonin in Human Urine. Molecules, 2017. 22(10).
5. Lindström, M., et al., Comparison of serum serotonin and serum 5-HIAA LC-MS/MS assays in the diagnosis of serotonin producing neuroendocrine neoplasms: A pilot study. Clin Chim Acta, 2018. 482: p. 78 – 83.
6. Ren, C., et al., Low levels of serum serotonin and amino acids identified in migraine patients. Biochem Biophys Res Commun, 2018. 496(2): p. 267 – 273.
7. Moriarty, M., et al., Development of an LC-MS/MS method for the analysis of serotonin and related compounds in urine and the identification of a potential biomarker for attention deficit hyperactivity/hyperkinetic disorder. Anal Bioanal Chem, 2011. 401(8): p. 2481 – 93.
8. Nichkova, M., et al., Evaluation of a novel ELISA for serotonin: urinary serotonin as a potential biomarker for depression. Anal Bioanal Chem, 2012. 402(4): p. 1593 – 600.
9. Holck, A., et al., Plasma serotonin levels are associated with antidepressant response to SSRIs. J Affect Disord, 2019. 250: p. 65 – 70.
10. Jaworek, A.K., et al., Depression and Serum Content of Serotonin in Adult Patients with Atopic Dermatitis. Adv Exp Med Biol, 2020. 1271: p. 83 – 88.
11. Shu, B., et al., Serotonin and YAP/VGLL4 Balance Correlated with Progression and Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 9739.
12. Mahato, K., et al., Novel electrochemical biosensor for serotonin detection based on gold nanorattles decorated reduced graphene oxide in biological fluids and in vitro model. Biosens Bioelectron, 2019. 142: p. 111502.
13. Yu, R., High Serum Serotonin Test Results Caused by Traumatic Vascular Access Due to Difficult Veins. Pancreas, 2019. 48(6): p. e51-e53.
14. Mamdouh, F., et al., Serum Serotonin as a Potential Diagnostic Marker for Hepatocellular Carcinoma. J Interferon Cytokine Res, 2019. 39(12): p. 780 – 785.

Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anfrage von Ihrem Anbieter gerne zur Verfügung gestellt.

11. Änderungen

| Version | Freigabedatum | Kapitel | Änderung |
|---------|---------------|---------|---|
| 17.1 | 2022-06-14 | Alle | Assay Revision aufgrund IVDR-Verordnung (EU) 2017/746. Aufgrund dieser Revision sind alle Kapitel überarbeitet und geändert worden. |
| 18.0 | 2023-03-20 | 7.1 | Satz: „Deutlich außerhalb des Referenzbereichs liegende Werte sollen ärztlich bewertet werden.“ hinzugefügt |

Symbole:

| | | | | | |
|---|-----------------------------|---|---------------|---|------------------------------------|
|  | Lagertemperatur |  | Hersteller |  | Enthält Testmaterial für <n> Teste |
|  | Verwendbar bis | LOT | Chargennummer | IVD | In vitro Diagnostikum |
|  | Gebrauchsanweisung beachten | CONT | Inhalt | CE | CE-Kennzeichnung |
|  | Achtung | REF | Katalognummer |  | Vertriebspartner |
|  | Herstellungsdatum | | | | |