



## Instructions for Use

# Serotonin FAST ELISA

IVD



REF EIA-5061

$\Sigma$  96



**DRG** 

DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)



**DRG** 

DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.  
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.  
Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.**

**Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen / Modifiche introdotte / Modificaciones introducidas /  
Modifications apportées / Modificações introduzidas**

The following changes have been made in comparison to the previous version:  
Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen:  
Rispetto alla versione precedente, sono state apportate le seguenti modifiche:  
Se han introducido los siguientes cambios en comparación con la versión anterior:  
Les modifications suivantes ont été apportées par rapport à la version précédente :  
Foram efetuadas as seguintes alterações em comparação com a versão anterior:

Added French version

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis**

1	INTRODUCTION.....	2
2	PROCEDURAL CAUTIONS, GUIDELINES, WARNINGS AND LIMITATIONS.....	2
3	STORAGE AND STABILITY .....	3
4	MATERIALS.....	4
5	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE .....	5
6	TEST PROCEDURE .....	5
7	CALCULATION OF RESULTS.....	6
8	QUALITY CONTROL .....	7
9	ASSAY CHARACTERISTICS.....	7
1	EINLEITUNG.....	10
2	VERFAHRENSHINWEISE, RICHTLINIEN, WARNUNGEN UND ANWENDUNGSGRENZEN .....	10
3	LAGERUNG UND HALTBARKEIT .....	12
4	MATERIALIEN .....	12
5	PROBENBEHANDLUNG UND LAGERUNG .....	13
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	13
7	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE .....	14
8	KONTROLLPROBEN.....	16
9	ASSAYCHARAKTERISTIKA.....	16
1	INTRODUCTION.....	18
2	PRÉCAUTIONS, RECOMMANDATIONS, MISES EN GARDE ET LIMITES DE LA PROCÉDURE .....	18
3	STOCKAGE ET STABILITÉ.....	20
4	MATÉRIEL .....	20
5	RECUEIL, MANIPULATION ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS.....	21
6	PROCÉDURE DE TEST .....	22
7	CALCUL DES RÉSULTATS.....	23
8	ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE .....	24
9	CARACTÉRISTIQUES DU TEST.....	24
10	REFERENCES/LITERATURE / REFERENZEN/LITERATUR.....	27
	SYMBOLS USED .....	28

## 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 °C - 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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 °C - 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 °C - 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

	<b>WASH-CONC 50x</b>	<b>Wash Buffer Concentrate</b> – concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 mL/vial, purple cap	
	<b>CONJUGATE</b>	<b>Antibody Conjugate</b> – ready to use
Content:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 mL/vial	
Description:	Species is goat, red cap	
	<b>SUBSTRATE</b>	<b>Substrate</b> – 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	
	<b>STOP-SOLN</b>	<b>Stop Solution</b> – ready to use
Content:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 mL/vial, grey cap	
	<b>W SER 5-HIAA</b>	<b>Serotonin Microtiter Strips</b> – ready to use
Content:	1 x 96 well (12 x 8) antibody precoated microwell plate in a resealable white pouch with desiccant	
	<b>ACYL-REAG</b>	<b>Acylation Reagent</b> – ready to use
Content:	Acylation reagent in DMSO	
Volume:	2 x 3 mL/vial, white cap	
	<b>SER-AS</b>	<b>Serotonin Antiserum</b> – ready to use
Content:	Rabbit anti-Serotonin antibody, blue coloured	
Volume:	1 x 6 mL/vial, blue cap	
Description:	Species is rabbit	
	<b>ACYL-BUFF</b>	<b>Acylation Buffer</b> – 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

Component	Colour/Cap	Concentration [ng/mL] (= µg/L)	Concentration [nmol/L]	Volume/Vial
<b>STANDARD A</b>	white	0	0	4 mL
<b>STANDARD B</b>	yellow	15	85	4 mL
<b>STANDARD C</b>	orange	50	284	4 mL
<b>STANDARD D</b>	blue	150	851	4 mL
<b>STANDARD E</b>	grey	500	2 840	4 mL
<b>STANDARD F</b>	black	2 500	14 175	4 mL
<b>CONTROL 1</b>	green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!		4 mL
<b>CONTROL 2</b>	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  $\mu$ L – 500  $\mu$ L
- 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 °C - 25 °C;  
up to 3 days at 2 °C - 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 °C - 8 °C).

Spontaneous urine (second morning urine): stabilized with 10  $\mu$ L 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 °C - 25 °C;  
up to 3 days at 2 °C - 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 °C - 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 °C - 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 °C - 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 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 °C - 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 **W SER 5-HIAA**.
2. Pipette **50 µL** of the **SER-AS** into all wells.
3. Incubate **60 min** at **RT** (20 °C - 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 °C - 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 °C - 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 – 2170 ng/mL
	Urine	8 – 2027 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:

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

### Conversion

$$\text{Serotonin [ng/mL]} \times 5.67 = \text{serotonin [nmol/L]}$$

**7.1 Expected reference values**

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.

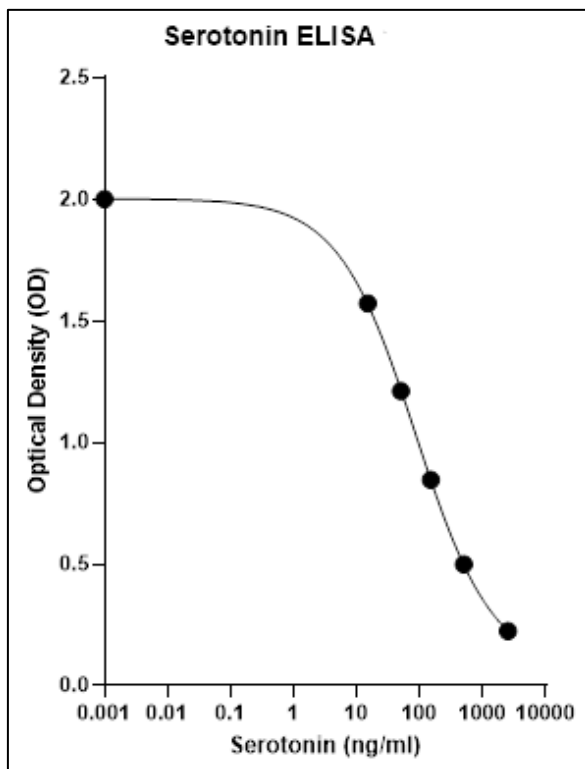
Expected reference ranges were determined in an internal study by testing samples from an apparently healthy European population (95% reference interval).

	<b>Serotonin</b>
Reference range 24-hour urine	9 – 193 µg/24 h 24 – 124 µg/g creatinine
Reference range Spontaneous urine (Second morning urine)	30 – 129 µg/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.

<b>Analytical Sensitivity</b>	<b>Serotonin</b>
Limit of Blank (LOB)	2.9 ng/mL
Limit of Detection (LOD)	5.9 ng/mL
Limit of Quantification (LOQ)	8.0 ng/mL



<b>Analytical Specificity (Cross Reactivity)</b>	
<b>Substance</b>	<b>Cross Reactivity (%)</b>
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 3<sup>rd</sup> ed.

<b>Method comparison ELISA vs. XLC-MS/MS</b>	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).

<b>Precision</b>					
<b>Intra-Assay</b>			<b>Inter-Assay</b>		
<b>Serum</b>			<b>Serum</b>		
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	1792 ± 109	6.1	6	1792 ± 165	9.2
<b>Urine</b>			<b>Urine</b>		
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	1798 ± 120	6.7	6	1798 ± 221	12.3

Recovery was determined according to the CLSI standard EP 34 1<sup>st</sup> ed.

<b>Recovery</b>			
	Range [ng/mL]	Mean [%]	Range [%]
Serum	49.4 – 1,046	98	84 – 112
Urine	10.0 – 1,023	91	82 – 98
<b>Linearity of sample dilution</b>			
	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.

<b>Linear range</b>	
Serum	18 – 2,170 ng/mL
Urine	20 – 2,027 ng/mL

<b>Lot-to-Lot</b>			
	Sample	Mean $\pm$ SD [ng/mL]	CV [%]
Serotonin in urine (n = 3)	1	118 $\pm$ 8.5	7.2
	2	549 $\pm$ 47.3	8.6
Serotonin in serum (n = 3)	1	90.3 $\pm$ 2.0	2.2
	2	755 $\pm$ 52.2	6.9

## 9.2 Metrological Traceability

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

<b>Standards und Controls</b>	Uncertainty [%]
	1.2%

<b>Serotonin FAST ELISA</b>		
	Concentration [ng/mL]	Expanded Uncertainty [%] k = 2*
Serum	61.6	25.1
	227	20.3
Urine	Concentration [ng/mL]	Expanded Uncertainty [%] k = 2*
	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%.

## 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-Antiseren 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 unbekanntenen 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 °C - 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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, Pfirsiche, 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 °C - 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 °C - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

### 4 MATERIALIEN

#### 4.1 Reagenzien im Kit

Inhalt:	<b>WASH-CONC 50x</b>	<b>Waschpufferkonzentrat</b> – 50x konzentriert
Volumen:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH 1 x 20 mL/Fläschchen, Deckel lila	
Inhalt:	<b>CONJUGATE</b>	<b>Enzymkonjugat</b> – gebrauchsfertig
Volumen:	Ziege anti-Kaninchen Immunoglobuline, konjugiert mit Peroxidase 1 x 12 mL/Fläschchen, Deckel rot	
Beschreibung:	Spezies ist Ziege	
Inhalt:	<b>SUBSTRATE</b>	<b>Substrat</b> – gebrauchsfertig
Volumen:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid 1 x 12 mL/Fläschchen, Deckel schwarz	
Inhalt:	<b>STOP-SOLN</b>	<b>Stopplösung</b> – gebrauchsfertig
Volumen:	0,25 M Schwefelsäure 1 x 12 mL/Fläschchen, Deckel grau	
Inhalt:	<b>III SER 5-HIAA</b>	<b>Serotonin Mikrotiterstreifen</b> – gebrauchsfertig
	1 x 96 Well (12 x 8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem weißen wiederverschließbaren Beutel	
Inhalt:	<b>ACYL-REAG</b>	<b>Azylierungsreagenz</b> – gebrauchsfertig
Volumen:	Azylierungsreagenz in DMSO 2 x 3 mL/Fläschchen, Deckel weiß	
Inhalt:	<b>SER-AS</b>	<b>Serotonin Antiserum</b> – gebrauchsfertig
Volumen:	Kaninchen anti-Serotonin Antikörper, blau gefärbt 1 x 6 mL/Fläschchen, Deckel blau	
Beschreibung:	Spezies ist Kaninchen	
Inhalt:	<b>ACYL-BUFF</b>	<b>Azylierungspuffer</b> – gebrauchsfertig
Volumen:	TRIS Puffer mit quecksilberfreien Konservierungsmitteln 1 x 55 mL/Fläschchen, Deckel grau	

#### 4.2 Kalibratoren und Kontrollen

**Standards and Kontrollen** – gebrauchsfertig

Komponente	Deckelfarbe	Konzentration [ng/mL] (= µg/L)	Konzentration nmol/L	Volumen/Fläschchen
STANDARD A	weiß	0	0	4 mL
STANDARD B	gelb	15	85	4 mL
STANDARD C	orange	50	284	4 mL
STANDARD D	blau	150	851	4 mL
STANDARD E	grau	500	2 840	4 mL
STANDARD F	schwarz	2 500	14 175	4 mL
CONTROL 1	grün	Die zu erwartenden Konzentrationen und		4 mL
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 µL – 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 °C - 25 °C;  
bis zu 3 Tage bei 2 °C - 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 Sammlerperiode ist das gesammelte Probenmaterial stets kühl und lichtgeschützt zu lagern (2 °C - 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 °C - 25 °C;  
bis zu 3 Tage bei 2 °C - 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 °C - 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 °C - 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 °C - 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** 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 °C - 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 **384 SER 5-HIAA** pipettieren.
2. Jeweils **50 µL SER-AS** in alle Wells pipettieren.
3. Platte **60 min** bei **RT** (20 °C - 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 °C - 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 °C - 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

	Serotonin	
<b>Messbereich</b>	Serum	8 – 2170 ng/mL
	Urin	8 – 2027 ng/mL

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannt 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:**

$$\text{Serotonin [ng/mL]} \times 5,67 = \text{Serotonin [nmol/L]}$$

**7.1 Erwartete Referenzbereiche**

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

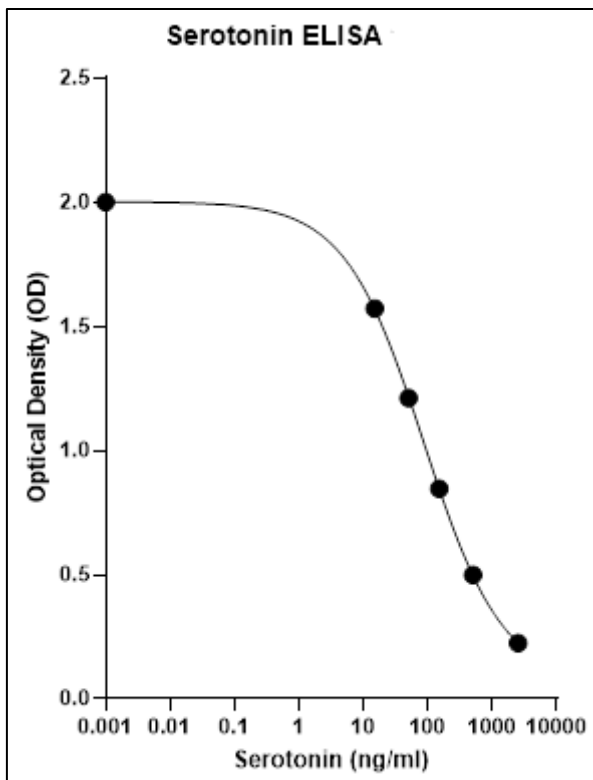
Als Grundlage für die interne Referenzbereichsbestimmung wurde folgende Probenanzahl für die jeweiligen Parameter berücksichtigt: 24h Sammelurin n = 194, Spontanurin (2. Morgenurin) n = 81, Serum n = 80. Die erwarteten Referenzbereiche wurden in einer internen Studie durch die Untersuchung von Proben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

	<b>Serotonin</b>
Referenzbereich 24-Stunden Urin	9 – 193 $\mu\text{g}/24 \text{ h}$ 24 – 124 $\mu\text{g}/\text{g Kreatinin}$
Referenzbereich Spontanurin (2. Morgenurin)	30 – 129 $\mu\text{g}/\text{g Kreatinin}$
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	1792 ± 109	6,1	6	1792 ± 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	1798 ± 120	6,7	6	1798 ± 221	12,3

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

<b>Wiederfindung</b>			
	Bereich [ng/mL]	Mittelwert [%]	Bereich [%]
Serum	49,4 – 1046	98	84 – 112
Urin	10,0 – 1023	91	82 – 98

<b>Linearität der Probenverdünnung</b>			
	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.

<b>Linearer Bereich</b>	
Serum	18 – 2170 ng/mL
Urin	20 – 2027 ng/mL

<b>Lot-zu-Lot</b>			
	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 FAST ELISA zugewiesenen Werte sind durch geeichte Wägung mit qualitätskontrollierten Analyten auf SI-Einheiten rückführbar.

<b>Standards und Kontrollen</b>	Unsicherheit [%]
	1,2

<b>Serotonin FAST ELISA</b>		
	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.

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Utilisation prévue et principe du test

Immunodosage enzymatique pour la mesure quantitative de la sérotonine dans l'urine et le sérum, permettant d'évaluer l'homéostasie sérotoninergique. Le dosage de la sérotonine dans l'urine est utile pour évaluer le neuro-stress.

La mesure quantitative de la sérotonine suit les principes de base de l'immunodosage enzymatique. Dans un premier temps, la sérotonine est soumise à une acylation quantitative. Le test ELISA compétitif est ensuite réalisé sur une plaque de microtitration. L'antigène est lié à la phase solide de la plaque de microtitration. Après acylation, les étalons, contrôles et échantillons entrent en compétition avec les analytes liés à la phase solide pour occuper un nombre fixe de sites de liaison d'anticorps. Une fois le système à l'équilibre, les antigènes libres et les complexes antigène-anticorps libres sont éliminés par rinçage. L'anticorps lié à la phase solide est détecté par un anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase en utilisant le TMB comme substrat, entraînant une réaction colorimétrique. La réaction est contrôlée à une longueur d'onde de 450 nm.

La quantification des échantillons inconnus est obtenue en comparant leur absorbance à une courbe de référence préparée à des concentrations standard connues. Un traitement manuel du test ELISA est recommandé. L'utilisation d'appareils de laboratoire automatisés se fait sous la responsabilité de l'utilisateur.

**Ce test de diagnostic in vitro est réservé à l'usage des professionnels.**

### 1.2 Applications cliniques

La sérotonine (5-hydroxytryptamine) est un produit intermédiaire du métabolisme du tryptophane [1], un neurotransmetteur bien étudié, et pourrait également agir comme une hormone périphérique [2]. Elle est synthétisée principalement dans les cellules entérochromaffines (cellules EC) du tractus gastro-intestinal et dans les neurones [1, 3]. Elle est présente en fortes concentrations dans les cellules EC de l'intestin, les neurones sérotoninergiques du cerveau et les plaquettes [1, 3-6]. La sérotonine est principalement dégradée en acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA) ou en mélatonine [1, 7] et peut être excrétée dans l'urine [8]. Dans la circulation sanguine, la grande majorité de la sérotonine est retrouvée dans les plaquettes [9] et elle peut être aisément détectée dans le sérum [1, 10, 11]. Les taux anormaux de sérotonine dans le sérum et/ou l'urine peuvent indiquer un dysfonctionnement aussi bien physique que psychologique.

Divers troubles peuvent être à l'origine d'une altération de l'équilibre de la sérotonine dans le sérum et/ou l'urine. Par exemple, une réduction des taux de sérotonine a été mise en évidence dans le cadre de la dépression, de l'anxiété, et même de la sensibilité à la douleur, par comparaison avec les sujets non affectés [6, 8, 10]. À l'inverse, une augmentation des taux de sérotonine a été rapportée chez les patients atteints de tumeurs neuroendocrines sécrétrices de sérotonine, également appelées tumeurs carcinoïdes [2, 12, 13], ou de carcinomes hépatocellulaires [14].

Les décisions thérapeutiques consécutives ne doivent jamais reposer sur les seuls résultats de l'analyse de laboratoire, même si ces résultats sont évalués conformément aux critères de qualité de la méthode. Les résultats des analyses de laboratoire ne constituent qu'une partie du tableau clinique complet du patient.

Si les résultats des analyses de laboratoire concordent de façon acceptable avec le tableau clinique global du patient, et dans ce cas uniquement, ils pourront être utilisés pour orienter les décisions thérapeutiques consécutives.

## 2 PRÉCAUTIONS, RECOMMANDATIONS, MISES EN GARDE ET LIMITES DE LA PROCÉDURE

### 2.1 Précautions, recommandations et mises en garde liées à la procédure

1. Ce kit est réservé à l'usage des professionnels. Pour pouvoir utiliser ce kit avec succès, les utilisateurs doivent avoir une compréhension approfondie de ce protocole. Seules les instructions fournies avec le kit sont valables et elles doivent être utilisées pour réaliser le test. Des performances fiables ne pourront être obtenues qu'en suivant strictement et attentivement les instructions fournies.
2. Ce test a été validé pour un type d'échantillon bien précis, comme indiqué dans la section « Utilisation prévue » (voir la rubrique 1). Toute utilisation de ce kit déviant de l'usage prévu se fait sous la responsabilité de l'utilisateur et le fabricant ne pourra en être tenu responsable.
3. Les principes des Bonnes pratiques de laboratoire (BPL) doivent être respectés.
4. Afin de limiter l'exposition à des substances potentiellement nocives, il convient de porter une blouse de laboratoire, des gants de protection jetables et des lunettes de protection, si nécessaire.
5. En cas de survenue d'un incident grave en lien avec ce produit, le fabricant et les autorités nationales compétentes devront en être avertis.
6. Tous les réactifs du kit et les échantillons devront être ramenés à température ambiante et être mélangés délicatement mais soigneusement avant utilisation. Pour procéder à la dilution ou la reconstitution, utiliser de l'eau déminéralisée, distillée ou ultra pure. Éviter les congélations et décongélations répétées des réactifs et échantillons.
7. La microplaque contient des barrettes sécables. Les puits inutilisés doivent être conservés entre 2 °C et 8 °C dans le sachet en aluminium fermé avec l'absorbant d'humidité et utilisés dans le cadre fourni. Les barrettes de microtitration qui sont retirées du cadre pour être utilisées doivent être identifiées en conséquence afin d'éviter toute confusion.

8. Il est fortement recommandé de réaliser le test de l'échantillon en double exemplaire.
9. Une fois le test débuté, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption. Veiller à préparer les réactifs, le matériel et les appareils nécessaires pour qu'ils puissent être utilisés au moment voulu.
10. Les temps d'incubation ont une influence sur les résultats. Tous les puits doivent être manipulés dans le même ordre et les mêmes délais.
11. Afin d'éviter la contamination croisée des réactifs, utiliser un nouvel embout de pipette jetable pour la distribution de chaque réactif, échantillon, étalon et contrôle.
12. Une courbe standard doit être établie pour chaque cycle.
13. Les contrôles doivent être inclus dans chaque cycle et doivent se situer dans l'intervalle de confiance établi. Les limites de l'intervalle de confiance sont indiquées dans le rapport de contrôle qualité (CQ) fourni avec le kit.
14. Ne pas mélanger des composants de kit portant des numéros de lot différents au cours d'un même test et ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.
15. Éviter tout contact avec la solution d'arrêt contenant 0,25 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Elle pourrait provoquer une irritation cutanée et des brûlures. En cas de contact avec les yeux ou la peau, rincer immédiatement sous l'eau.
16. Le substrat TMB a un effet irritant sur la peau et les muqueuses. En cas de possible contact, laver abondamment les yeux avec de l'eau et laver la peau avec du savon et de l'eau en abondance. Rincer les objets contaminés avant de les réutiliser.
17. Pour plus d'informations concernant les substances dangereuses contenues dans le kit, veuillez vous reporter à la fiche de données de sécurité (FDS). La fiche de données de sécurité de ce produit peut être obtenue directement sur le site internet du fabricant ou sur demande.
18. Les réactifs du kit doivent être considérés comme des déchets dangereux et être éliminés conformément aux réglementations nationales.
19. Les valeurs de référence attendues présentées dans cette notice d'utilisation sont fournies uniquement à titre indicatif. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres intervalles de référence.
20. En cas de détérioration sévère du kit de test ou de ses composants, le fabricant doit en être informé par écrit, au plus tard une semaine après la réception du kit. Les composants sévèrement endommagés ne doivent pas être utilisés pour réaliser un cycle de test. Ils doivent être stockés de façon appropriée jusqu'à ce que le fabricant décide ce qu'il convient d'en faire. S'il est décidé qu'ils ne sont plus utilisables pour les mesures, ils devront être éliminés conformément aux réglementations nationales.
21. Les résultats obtenus avec ce kit de test ne devront pas motiver à eux seuls les décisions thérapeutiques consécutives, mais devront être corrélés à d'autres tests diagnostiques et observations cliniques.

## 2.2 Limites

Toute manipulation inadéquate des échantillons ou modification de ce test est susceptible d'influer sur les résultats.

Si vous avez d'autres questions, veuillez contacter le fabricant.

### 2.2.1 Substances pouvant interférer et manipulation appropriée des échantillons

#### Urine

Attention au recueil de l'échantillon! Il ne peut être exclu que des concentrations élevées en acide entraînent des résultats incorrects. Jusqu'à 30 µL d'acide acétique à 100 % pour 1 mL d'urine, aucune influence sur les résultats n'a été observée.

#### Serum

La présence de précipités ou de filaments de fibrine dans les échantillons peut conduire à des résultats inexacts.

Les échantillons hémolytiques (jusqu'à 2 mg/mL d'hémoglobine), ictériques (jusqu'à 50 mg/dL de bilirubine) et lipémiques (jusqu'à 834 mg/dL de triglycérides) n'ont aucune influence sur les résultats du dosage.

Si les concentrations ne peuvent pas être estimées et qu'il est incertain si les limites supérieures fixées pour les échantillons hémolytiques, ictériques ou lipémiques sont respectées, les échantillons ne devront pas être utilisés pour effectuer le dosage.

### 2.2.2 Interférences liés aux médicaments et aux aliments

Les aliments et stimulants suivants peuvent affecter la teneur en sérotonine de l'échantillon. Alcool, ananas, aubergine, avocat, banane, pamplemousse, raisins secs, cacao, kiwi, caféine, melon, mirabelle, nicotine, noix de pécan, pêche, prune, chocolat, groseille, tomate, noix. Certains médicaments peuvent également affecter les taux de sérotonine dans l'échantillon. Par exemple, la prise d'amphétamines, d'acétanilide, de coumariniques, d'éphédrine, de guaïfénésine, de méphénésine (carbamate), de méthocarbamol, d'inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO), d'acétaminophène, de phénacétine, de phénobarbital, de phentolamine ou de réserpine peut entraîner une augmentation des taux de sérotonine. À l'inverse, l'acide acétylsalicylique, la chlorpromazine, l'isoniazide, la lévodopa, la méthénamine, la méthyldopa, la prométhazine, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) ou la streptozocine peuvent conduire à une diminution des taux de sérotonine.

Par conséquent, 2 à 4 jours avant le recueil de l'échantillon, ces aliments devront être évités et la prise de ces médicaments devra être interrompue si la situation médicale le justifie.

### 2.2.3 Effet d'inversion à haute dose (effet crochet ou « Hook effect »)

Aucun effet crochet n'a été observé avec ce test.

## 3 STOCKAGE ET STABILITÉ

Conserver le kit et les réactifs entre 2 °C et 8 °C jusqu'à la date de péremption. Ne pas utiliser le kit et les composants après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit. Après ouverture, les réactifs restent stables pendant 2 mois s'ils sont conservés entre 2 °C et 8 °C. Une fois que le sachet refermable contenant la plaque ELISA a été ouvert, veiller à bien le refermer en laissant l'absorbeur d'humidité à l'intérieur.

## 4 MATÉRIEL

### 4.1 Contenu du kit

	<b>WASH-CONC 50x</b>	<b>Tampon de lavage concentré – concentré 50x</b>
Contenu:	Tampon avec détergent non ionique et pH physiologique	
Volume:	1 × 20 mL/flacon, couvercle violet	
	<b>CONJUGATE</b>	<b>Conjugué enzymatique – prêt à l'emploi</b>
Contenu:	Immunoglobulines de chèvre anti-lapin conjuguées à la peroxydase	
Volume:	1 × 12 mL/flacon, couvercle rouge	
Description:	L'espèce est la chèvre	
	<b>SUBSTRATE</b>	<b>Substrat – prêt à l'emploi</b>
Contenu:	Substrat chromogène contenant 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine, tampon substrat et peroxyde d'hydrogène	
Volume:	1 × 12 mL/flacon, couvercle noir	
	<b>STOP-SOLN</b>	<b>Solution d'arrêt – prête à l'emploi</b>
Contenu:	0,25 M d'acide sulfurique	
Volume:	1 × 12 mL/flacon, couvercle gris	
	<b>MI SER 5-HIAA</b>	<b>Barrettes de microtitration de la sérotonine – prêtes à l'emploi</b>
Contenu:	1 × 96 puits (12×8), microplaque à puits pré-enduite d'antigène dans un sachet blanc refermable avec absorbeur d'humidité	
	<b>ACYL-REAG</b>	<b>Réactif d'acylation – prêt à l'emploi</b>
Contenu:	Réactif d'acylation dans du DMSO	
Volume:	2 × 3 mL/flacon, couvercle blanc	
	<b>SER-AS</b>	<b>Antisérums sérotonine – prêt à l'emploi</b>
Contenu:	Anticorps de lapin anti-sérotonine, de couleur bleue	
Volume:	1 × 6 mL/flacon, couvercle bleu	
Description:	L'espèce est le lapin	
	<b>ACYL-BUFF</b>	<b>Tampon d'acylation – prêt à l'emploi</b>
Contenu:	Tampon TRIS avec conservateur sans mercure	
Volume:	1 × 55 mL/flacon, couvercle gris	

## 4.2 Étalonnage et contrôles

### Étalons et contrôles – prêts à l'emploi

Composant	Couleur/cou vercle	Concentration [ng/mL] (= µg/L)	Concentration [nmol/L]	Volume/ flacon
STANDARD A	blanc	0	0	4 mL
STANDARD B	jaune	15	85	4 mL
STANDARD C	orange	50	284	4 mL
STANDARD D	bleu	150	851	4 mL
STANDARD E	gris	500	2 840	4 mL
STANDARD F	noir	2 500	14 175	4 mL
CONTROL 1	vert	Voir le rapport CQ pour les valeurs attendues et les intervalles acceptables.		4 mL
CONTROL 2	rouge			4 mL

Conversion: sérotonine [ng/mL] × 5,67 = sérotonine [nmol/L]

Contenu: Tampon TRIS avec conservateur sans mercure, enrichi d'une quantité définie de sérotonine

### 4.3 Matériel supplémentaire requis mais non fourni dans le kit

- Eau (deminéralisée, distillée ou ultra pure)
- Matériau absorbant (serviette en papier)
- Tubes à essai, d'au moins 3 mL, en polypropylène/polystyrol

### 4.4 Équipement supplémentaire requis mais non fourni dans le kit

- Pipettes de précision calibrées pour la distribution de volumes compris entre 20 et 500 µL
- Appareil de lavage pour plaque de microtitration (manuel, semi-automatisé ou automatisé)
- Lecteur ELISA capable de lire l'absorbance à 450 nm et, si possible, à 620 – 650 nm
- Agitateur pour plaque de microtitration (amplitude d'agitation de 3 mm; env. 600 tours/min)
- Agitateur Vortex

## 5 RECUEIL, MANIPULATION ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

### Sérum

Recueillir le sang par ponction veineuse, laisser coaguler et séparer le sérum par centrifugation en suivant les instructions du fabricant, à température ambiante. Ne pas centrifuger avant coagulation complète. Le temps nécessaire à la coagulation peut être prolongé chez les patients recevant un traitement anticoagulant. Les taux sériques de sérotonine peuvent fluctuer au cours de la journée. Par conséquent, l'échantillon de sang doit toujours être recueilli au même moment de la journée. Un accès vasculaire traumatique peut entraîner une augmentation drastique des taux de sérotonine.

En cas de doute, il est recommandé de ne pas utiliser les échantillons hémolytiques, ictériques et lipémiques pour le test (voir rubrique 2.2.1).

Stockage: maximum 1 jour entre 18 °C et 25 °C;  
maximum 3 jours entre 2 °C et 8 °C;  
au-delà (jusqu'à 6 mois), stocker à -20 °C.

Les congélations et décongélations répétées doivent être évitées. Veiller à toujours conserver les échantillons à l'abri de la lumière.

## Urine

Les échantillons d'urine recueillis sur 24 heures ainsi que les échantillons issus de la miction spontanée (deuxièmes urines du matin) peuvent être utilisés pour l'analyse.

Urine recueillie sur 24 heures: Sur une période définie de 24 heures, la totalité de l'urine est recueillie dans un flacon avec l'acide (10 – 15 mL d'acide acétique à 100 %) fourni pour la stabilisation et le volume total est noté pour l'évaluation des résultats. Pendant la période de collecte, l'échantillon recueilli doit être conservé en permanence dans un endroit frais (entre 2 °C et 8 °C), à l'abri de la lumière.

Miction spontanée (deuxièmes urines du matin): un échantillon stabilisé à l'aide de 10 µL d'acide acétique à 100 % pour 1 mL d'urine peut être utilisé. Veiller à toujours conserver les échantillons à l'abri de la lumière. Une mesure de la créatinine est nécessaire pour la normalisation.

Lors de la stabilisation de l'urine, tenir compte de l'acidité (voir rubrique 2.2.1).


Stockage: maximum 1 jour entre 18 °C et 25 °C;  
maximum 3 jours entre 2 °C et 8 °C;  
au-delà (jusqu'à 6 mois), stocker à -20 °C.


Les congélations et décongélations répétées doivent être évitées.

## 6 PROCÉDURE DE TEST

Laisser tous les réactifs et échantillons revenir à température ambiante et mélanger soigneusement en les retournant délicatement avant utilisation. Numérotter les tubes à essai et les microplaques (les barrettes de microtitration qui sont retirées du cadre pour être utilisées doivent être identifiées en conséquence afin d'éviter toute confusion). Il est recommandé d'effectuer les dosages en double exemplaire.

La fixation de l'antisérum et du conjugué enzymatique ainsi que l'activité de l'enzyme sont dépendantes de la température. Plus la température est haute, plus les valeurs d'absorption seront élevées. La variation des temps d'incubation aura une influence similaire sur l'absorbance. La température optimale au cours de l'immunodosage enzymatique est de 20 °C à 25 °C.

 *Il est impératif d'utiliser un agitateur pour plaque de microtitration disposant des spécifications suivantes : amplitude d'agitation de 3 mm ; env. 600 tours/min. Un paramétrage différent lors de l'agitation est susceptible d'influer sur les résultats.*

 *Au cours de l'immunodosage enzymatique, ne pas dépasser la température de 20 °C à 25 °C et les temps d'incubation prescrits. Une température trop élevée au cours de l'immunodosage enzymatique ou des temps d'incubation trop longs pourraient influer sur les résultats.*

 *Les étapes de rinçage doivent être réalisées avec soin! Un rinçage mal effectué pourrait influer sur les résultats.*

### 6.1 Préparation des réactifs et remarques supplémentaires

#### Tampon de lavage

Diluer les 20 mL de tampon de lavage concentré **WASH-CONC 50x** avec de l'eau de façon à obtenir un volume final de 1 000 mL.

Stockage: 2 mois entre 2 °C et 8 °C

#### Barrettes de microtitration de la sérotonine

Dans de rares cas, des résidus du réactif de blocage et de stabilisation peuvent être observés dans les puits sous la forme de petites taches ou lignes blanches. Ces résidus n'ont pas d'influence sur la qualité du produit.

#### Réactif d'acylation

Le point de solidification du réactif d'acylation est de 18,5 °C. Pour garantir que le réactif d'acylation est bien liquide lors de son utilisation, il convient de s'assurer qu'il revienne à température ambiante et prenne la forme d'une solution homogène exempte de cristallisation avant de l'utiliser.

Si un volume supérieur à 3 mL est requis, regrouper le contenu de plusieurs flacons **ACYL-REAG** individuels et mélanger soigneusement.

**6.2 Préparation des échantillons – acylation**

1. Pipeter **20 µL** des **étalons, contrôles et échantillons** dans les tubes à essai correspondants.
  2. Ajouter **500 µL** d'**ACYL-BUFF** dans tous les tubes.
  3. Ajouter **50 µL** d'**ACYL-REAG** dans tous les tubes.
  4. Mélanger soigneusement les tubes à essai (agitateur vortex) et incuber pendant **15 min à température ambiante** (20 °C à 25 °C).
  5. Ajouter **500 µL d'eau** dans tous les tubes et mélanger soigneusement (agitateur vortex).
- ⚠ Prélever **20 µL** des **étalons, contrôles et échantillons acylés** pour le **dosage ELISA de la sérotonine**.

**6.3 Dosage ELISA de la sérotonine**

1. Pipeter **20 µL** des **étalons, contrôles et échantillons acylés** dans les puits appropriés de la plaque **W SER 5-HIAA**.
  2. Pipeter **50 µL** de **SER-AS** dans tous les puits.
  3. Incuber pendant **60 min à température ambiante** (20 °C à 25 °C) sur un **agitateur** (env. 600 tours/min).
  4. Jeter ou aspirer le contenu des puits. Rincer la plaque à **4 reprises** en ajoutant **300 µL** de **tampon de lavage**, **éliminer** le contenu et **sécher à chaque fois** en tapotant la plaque retournée sur le matériau absorbant.
  5. Pipeter **100 µL** de **CONJUGATE** dans chaque puits.
  6. Incuber **pendant 30 min à température ambiante** (20 °C à 25 °C) sur un **agitateur** (env. 600 tours/min).
  7. Jeter ou aspirer le contenu des puits. Rincer la plaque à **4 reprises** en ajoutant **300 µL** de **tampon de lavage**, **éliminer** le contenu et **sécher à chaque fois** en tapotant la plaque retournée sur le matériau absorbant.
  8. Pipeter **100 µL** de **SUBSTRATE** dans chaque puits..
  9. Incuber **pendant 25 ± 5 min à température ambiante** (20 °C à 25 °C) sur un **agitateur** (env. 600 tours/min).
- ⚠ **Éviter toute exposition à la lumière directe du soleil!**
10. Ajouter **100 µL** de **STOP-SOLN** dans tous les puits et agiter brièvement la plaque de microtitration.
  11. **Lire** l'absorbance de la solution dans les puits dans les 10 min à l'aide d'un lecteur de microplaque réglé à **450 nm** (si possible, une longueur d'onde de référence comprise entre 620 nm et 650 nm est recommandée).

**7 CALCUL DES RÉSULTATS**

	Sérotonine	
Plage de mesure	Sérum	8 – 2170 ng/mL
	Urine	8 – 2027 ng/mL

La courbe standard, qui peut être utilisée pour déterminer la concentration des échantillons inconnus, est obtenue en reportant sur le graphique les valeurs d'absorbance (calculer l'absorbance moyenne) des étalons (linéaires, axe y) en regard des concentrations standard correspondantes (logarithmiques, axe x) en utilisant une concentration de 0,001 ng/mL pour l'étalon « Standard A » (cet alignement est impératif en raison de la présentation logarithmique des données). Utiliser la régression non linéaire pour l'ajustement de la courbe (4 paramètres, Marquardt, par ex.).

⚠ *Ce test est un dosage par compétition. Cela signifie que les valeurs de DO diminuent lorsque les concentrations de l'analyte augmente. Les valeurs de DO qui se révèlent inférieures à la courbe standard correspondent à des concentrations élevées de l'analyte dans l'échantillon et doivent être rapportées comme positives.*

Les concentrations des échantillons et des contrôles peuvent être lues directement à partir de la courbe standard.

Les échantillons dont les concentrations se révèlent supérieures à l'étalon le plus élevé (Standard F) doivent être dilués en conséquence à l'aide de l'étalon « Standard A » et être réanalysés.

La quantité totale de **sérotonine** excrétée dans l'urine sur 24 h est calculée comme suit:

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

La quantité de **sérotonine** normalisée selon la créatinine est calculée comme suit:

$$\mu\text{g}/\text{g} \text{ de créatinine} = \text{ng}/\text{mL} \text{ (sérotonine)} / \text{créatinine} \text{ (mg}/\text{dL}) \times 100$$

**Conversion**

$$\text{Sérotonine [ng/mL]} \times 5.67 = \text{sérotonine [nmol/L]}$$



## 7.1 Valeurs de référence attendues

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs de référence.

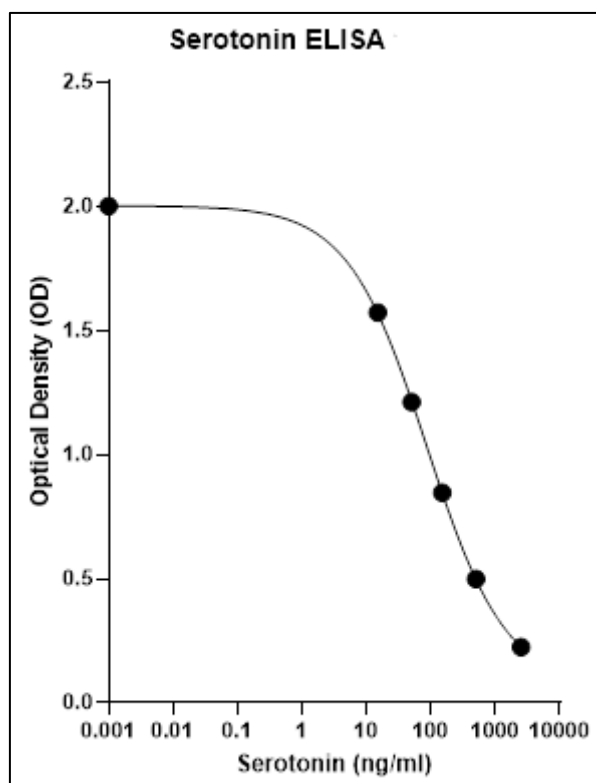
À la base, pour la détermination de l'intervalle de référence interne, le nombre d'échantillons suivant a été pris en considération pour les paramètres correspondants: urine recueillie sur 24 heures: n = 194; miction spontanée (deuxièmes urines du matin): n = 81; sérum: n = 80. Les plages de référence attendues ont été déterminées dans le cadre d'une étude interne en testant des échantillons issus d'une population européenne apparemment saine (intervalle de référence à 95 %).

	Sérotonine
Plage de référence Urine recueillie sur 24 heures	9 – 193 µg/24 h 24 – 124 µg/g créatinine
Plage de référence Miction spontanée (deuxièmes urines du matin)	30 – 129 µg/g créatinine
Plage de référence sérum	20 – 206 ng/mL

Les valeurs s'écartant significativement de la plage de référence doivent être évaluées par un médecin.

## 7.2 Courbe standard type

⚠ Exemple: Ne pas utiliser pour le calcul!



## 8 ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE

Il est recommandé d'utiliser des échantillons de contrôle conformément aux réglementations nationales. Utiliser à la fois des contrôles normaux et des contrôles pathologiques. Les échantillons de contrôle obtenus dans le commerce doivent être traités comme des échantillons inconnus. Les échantillons de contrôle doivent se situer dans les limites de l'intervalle de confiance établi. Les limites de l'intervalle de confiance des contrôles fournis dans le kit sont indiquées dans le rapport CQ.

## 9 CARACTÉRISTIQUES DU TEST

### 9.1 Données de performances

La sensibilité analytique a été déterminée conformément à la norme CLSI EP17-A2 vol. 32 no. 8.

Pour déterminer la sensibilité analytique, 5 échantillons blancs et 5 échantillons à faible concentration de 2 lots de kit ont été analysés en 4 exemplaires par échantillon. Au total, 60 résultats de blanc et 60 résultats à faible concentration ont ainsi été obtenus par lot.

Sensibilité analytique	Sérotonine
Limite du blanc (LOB)	2.9 ng/mL
Limite de détection (LOD)	5.9 ng/mL
Limite de quantification (LOQ)	8.0 ng/mL

Spécificité analytique (réactivité croisée)	
Substance	Réactivité croisée (%)
Tryptamine	0.171
Mélatonine	< 0.1
Acide 5-hydroxyindole acétique	< 0.1
Phénylalanine	< 0.1
Histidine	< 0.1
Tyramine	< 0.1
5-hydroxytryptophane	< 0.1

La précision de la variation intra-test et inter-test a été évaluée en déterminant la concentration dans 6 échantillons de sérum et 6 échantillons d'urine sur deux cycles par jour en 2 exemplaires à chaque fois pendant 20 jours (conformément à la norme CLSI EP05-A3 vol. 34 no. 13).

Précision					
Intra-test			Inter-test		
Sérum			Sérum		
Échantillon	Moyenne ± ET [ng/mL]	CV [%]	Échantillon	Moyenne ± ET [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		
Échantillon	Moyenne ± ET [ng/mL]	CV [%]	Échantillon	Moyenne ± ET [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

Lot-à-lot			
	Échantillon	Moyenne ± ET [ng/mL]	CV [%]
Sérotonine dans l'urine (n = 6)	1	103 ± 6,5	6,4
	2	734 ± 63,3	8,6
Sérotonine dans le sérum (n = 6)	1	97,6 ± 7,9	8,1
	2	790 ± 62,3	7,9

La récupération a été déterminée conformément à la norme CLSI EP 34 1re éd.

Récupération			
	Plage [ng/mL]	Moyenne [%]	Plage [%]
Sérum	49,4 – 1 046	98	84 – 112
Urine	10,0 – 1 023	91	82 – 98

<b>Linéarité de la dilution de l'échantillon</b>			
	Dilution en série jusqu'à	Moyenne [%]	Plage [%]
Sérum	1 : 64	103	93 – 113
Urine	1 : 64	98	88 – 111

La linéarité au sein de la plage de mesure a été déterminée conformément à la norme CLSI EP06-Ed2. La linéarité est établie sous réserve que la valeur déterminée ne s'écarte pas de plus de 20 % de la valeur prévue.

<b>Plage de linéarité</b>	
Sérum	18 – 2 170 ng/mL
Urine	20 – 2 027 ng/mL

La comparaison de la méthode a été réalisée conformément à la norme CLSI EP09c 3e éd.

<b>Comparaison de la méthode ELISA par rapport à la XLC-MS/MS</b>	
Sérum	$y = 0,99x - 9,2; r^2 = 0,996; n = 100$
Urine	$y = 0,9x - 20,7; r^2 = 0,988; n = 97$

## 9.2 Traçabilité métrologique

Les valeurs attribuées aux étalons et aux contrôles du test Serotonin ELISA Fast Track sont traçables aux unités SI sur la base de l'analyte de qualité contrôlée.

<b>Étalons et contrôles</b>	Incertitude [%]
	1,2 %

<b>Sérotonine Fast ELISA</b>		
	Concentration [ng/mL]	Incertitude étendue [%] k = 2*
Sérum	61,6	25,1
	227	20,3
Urine	Concentration [ng/mL]	Incertitude étendue [%] k = 2*
	18.1	44,5
	55.2	23,5
	153	19,2
	240	18,4
	498	18,0
	1,798	24,7

\* Définit un intervalle autour du résultat mesuré qui inclura la valeur réelle avec une probabilité de 95 %.

**10 REFERENCES / LITERATURE / 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.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.

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

Pour obtenir une documentation mise à jour ou toute autre information, veuillez contacter votre fournisseur local.

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
<b>IVD</b>	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
<b>REF</b>	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
<b>LOT</b>	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks*	Biologische Risiken*	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
<b>RUO</b>	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité