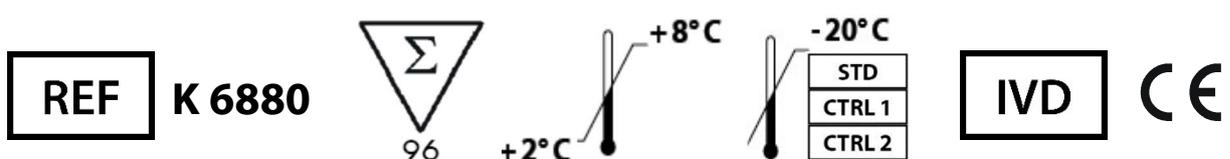


# IDK<sup>®</sup> Serotonin ELISA

**Zur in-vitro-Bestimmung von Serotonin (5-HT) in humanem Serum  
und Trockenblutproben**

**For the in vitro determination of serotonin (5-HT) in human serum  
and dried blood spots**

Gültig ab / Valid from 2023-11-07



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>                          | <b>2</b>  |
| <b>2. INHALT DER TESTPACKUNG</b>                    | <b>2</b>  |
| <b>3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b> | <b>2</b>  |
| <b>4. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>  | <b>3</b>  |
| <b>5. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>          | <b>4</b>  |
| <i>Serumproben</i>                                  | 4         |
| <i>Trockenblutproben</i>                            | 4         |
| <b>6. TESTDURCHFÜHRUNG</b>                          | <b>5</b>  |
| <i>Testprinzip</i>                                  | 5         |
| <i>Pipettierschema Derivatisierung</i>              | 5         |
| <i>Pipettierschema Testdurchführung</i>             | 6         |
| <b>7. ERGEBNISSE</b>                                | <b>7</b>  |
| <b>8. EINSCHRÄNKUNGEN</b>                           | <b>8</b>  |
| <i>Biotininterferenz</i>                            | 8         |
| <b>9. QUALITÄTSKONTROLLE</b>                        | <b>9</b>  |
| <i>Referenzwerte</i>                                | 9         |
| <b>10. TESTCHARAKTERISTIKA</b>                      | <b>9</b>  |
| <i>Genauigkeit – Präzision</i>                      | 9         |
| <i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>                    | 10        |
| <i>Linearität</i>                                   | 10        |
| <i>Analytische Sensitivität</i>                     | 11        |
| <i>Analytische Spezifität</i>                       | 11        |
| <b>11. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>                      | <b>11</b> |
| <b>12. TECHNISCHE MERKMALE</b>                      | <b>12</b> |
| <b>13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>             | <b>12</b> |
| <b>14. LITERATUR</b>                                | <b>13</b> |

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die quantitative Bestimmung von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) aus humanem Serum und Trockenblut geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. INHALT DER TESTPACKUNG

| Art.-Nr.     | Bezeichnung | Kit-Komponenten   | Menge                  |
|--------------|-------------|---|------------------------|
| K 6880       | PLATE       | Mikrotitermodul, vorbeschichtet                                     | 12 x 8<br>Vertiefungen |
| K 6880       | STD         | Standards, gebrauchsfertig<br>(0, 10, 30, 100, 250, 750 ng/ml)      | 6 x 500 µl             |
| K 6880       | CTRL 1      | Kontrolle, gebrauchsfertig<br>(Bereich der Spezifikation entnehmen) | 1 x 500 µl             |
| K 6880       | CTRL 2      | Kontrolle, gebrauchsfertig<br>(Bereich der Spezifikation entnehmen) | 1 x 500 µl             |
| K 6880       | ACTSOL      | Aktivierungslösung, gebrauchsfertig                                 | 1 x 7 ml               |
| K 0001.C.100 | WASHBUF     | Waschpufferkonzentrat, 10x  | 2 x 100 ml             |
| K 6880       | CONJ        | Konjugat, peroxidase markiert,<br>gebrauchsfertig                   | 1 x 12 ml              |
| K 6880       | REABUF      | Reaktionspuffer, gebrauchsfertig                                    | 1 x 70 ml              |
| K 6880       | DER         | Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert                              | 1 x 100 mg             |
| K 0008.07    | DMSO        | Dimethylsulfoxid (DMSO)   | 1 x 7 ml               |
| K 6880       | AB          | Serotonin-Antikörper, gebrauchsfertig                               | 1 x 6 ml               |
| K 0002.15    | SUB         | Substrat (Tetramethylbenzidin),<br>gebrauchsfertig                  | 1 x 15 ml              |
| K 0003.15    | STOP        | Stopplösung, gebrauchsfertig  | 1 x 15 ml              |

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

## 3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*

- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 6)

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C ( $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ).

#### 4. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehaltes im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das bei **2-8 °C** gelagerte **WASHBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2-8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die gebrauchsfertigen **Standards und Kontrollen (STD/CTRL)** werden bei **-20°C** gelagert. Sie sind so bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor Gebrauch die Standards und Kontrollen auftauen und kurz vortexen. Nach Gebrauch wieder einfrieren.
- **DMSO** kristallisiert bei 2-8 °C aus. Vor Gebrauch das DMSO auf Raumtemperatur bringen, um die Kristalle zu lösen.
- Das **lyophilisierte Derivatisierungsreagenz (DER)** ist, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Vor dem Öffnen auf Raumtemperatur bringen. Das DER (100 mg) wird mit **6 ml DMSO** rekonstituiert, zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen und anschließend gründlich gemischt. Das **Derivatisierungsreagenz** (gelöstes DER) ist **2 Monate bei 2-8 °C** haltbar. Das Derivatisierungsreagenz vor dem erneuten Gebrauch wieder auf

Raumtemperatur bringen. Bitte beachten: DMSO greift Plastik an, DMSO reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.

- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2-8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 5. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### *Serumproben*

Die Haltbarkeit der Serumproben beträgt bei 2-8 °C bis zu 48 Stunden. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden. Serotonin ist lichtempfindlich, daher müssen die Proben nach der Abnahme kühl und dunkel gelagert werden.

Die Serumproben werden **unverdünnt** verwendet.

Zur weiteren Vorbereitung werden die Proben mit einem Derivatisierungsreagenz versetzt (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

### *Trockenblutproben*

#### **Trockenblutgewinnung und -lagerung**

Als Probenmaterial eignen sich **50 µl Vollblut**, die auf einen von Immundiagnostik AG freigegebenen Trockenprobenträger für Serotonin aufgetropft und vollständig getrocknet sind. Die Trockenblutträger müssen vorbehandelt sein, wir empfehlen DrySpot-ID für Serotonin (Katalognummer DZ9021ID Serotonin) als Trockenblutträger. Die benetzten Karten sind lichtgeschützt für 1 Woche bei Raumtemperatur stabil. Zur längeren Lagerung empfehlen wir, die Karten trocken bei -20°C aufbewahren.

#### **Vorbereitung der Trockenblutproben**

|    |   |
|----|---|
| 1. | Filter aus Testbrief entnehmen und in ein beschriftetes 1,5-ml-Reaktionsgefäß aus Polypropylen geben. |
| 2. | <b>50 µl Aktivierungslösung</b> (ACTSOL) auf die getrocknete Blutprobe pipettieren.                   |
| 3. | <b>15-30 min</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) stehen lassen.   |

Zur weiteren Vorbereitung werden die Proben mit einem Derivatisierungsreagenz versetzt (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

## 6. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Serotonin aus humanem Serum und Trockenblut. Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen Serotonin versetzt. Anschließend wird die derivatisierte Probe zusammen mit einem polyklonalen Serotonin-Antiserum in einer mit Serotonin-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein peroxidasemarkierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die Serotonin-Antikörper bindet. Nach einem Waschschritt zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des gemessenen Analyten, d.h. mit steigender Serotonin-Konzentration in der Probe reduziert sich die Konzentration der an den Tracer gebundenen Antikörper und das Signal nimmt ab. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standard-konzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### *Pipettierschema Derivatisierung*

Vor Gebrauch alle **Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15-30 °C) bringen, gut mischen.

Die Derivatisierung der Standards, der Kontrollen und der Proben wird in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen) durchgeführt.

Wir empfehlen, pro Standard, Kontrolle und Probe je eine Derivatisierung durchzuführen und diese jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Mikrotiterplatte aufzutragen.

- |    |   |
|----|---|
| 1. | <b>25 µl Standard (STD)/ Kontrolle (CTRL)/ Serumprobe</b> in beschriftete Mikroreaktionsgefäße pipettieren. |
|----|---|

|    |   |
|----|---|
| 2. | <b>500 µl Reaktionspuffer</b> (REABUF) in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Serumproben) sowie in die Gefäße mit den vorbereiteten Trockenblutproben pipettieren.  |
| 3. | <b>50 µl Derivatisierungsreagenz</b> (DER) in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Serum, Trockenblut) pipettieren und <b>gründlich mischen</b> durch mehrere Sekunden Vortexen oder mehrmaliges Umdrehen.<br>Bei den Trockenblutträgern sicherstellen, dass sie rundum mit Flüssigkeit bedeckt sind. |
| 4. | <b>30 min</b> bei <b>Raumtemperatur</b> (15-30 °C) auf einem Horizontalschüttler inkubieren.  |

2 x 50 µl der derivatisierten Standards, Kontrollen und Proben werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

### *Pipettierschema Testdurchführung*

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben in Doppelbestimmung in einem Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden.

|     |  |
|-----|--|
| 5.  | <b>2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben</b> als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.                                     |
| 6.  | <b>50 µl Serotonin-Antikörper</b> (AB) in jede Vertiefung pipettieren.   |
| 7.  | Streifen mit Folie dicht abkleben und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter <b>Schütteln</b> inkubieren.   |
| 8.  | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. |
| 9.  | <b>100 µl Konjugat</b> (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.  |
| 10. | Streifen abkleben und <b>30 min</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) unter <b>Schütteln</b> inkubieren.   |

|     |  |
|-----|--|
| 11. | Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.   |
| 12. | <b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.   |
| 13. | <b>10-14 min*</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) im <b>Dunkeln</b> inkubieren.  |
| 14. | <b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.  |
| 15. | <b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden. |

\* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automatenpezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Auf folgende Punkte ist zu achten:

Eine Derivatisierung der Proben ist sowohl in 30 Minuten auf einem Horizontal-schüttler als auch, nach sorgfältigem Durchmischen, in 90 Minuten ohne Schütteln in einem Automaten möglich. Bei automatisierter Abarbeitung dürfen unter Wahrung der jeweiligen Verdünnungen die Volumina von Proben und Verdünnern skaliert werden. Gerätespezifische Minimal- und Maximalvolumina sind zu beachten. Die Homogenität der resultierenden Verdünnung ist zu gewährleisten.

Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

## 7. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion.

### 1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse

muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z.B. 0,001).

## 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

## 3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

### Serum

Es wird **kein Faktor** benötigt.

### Trockenblut

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Faktor 2,3** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

## 8. EINSCHRÄNKUNGEN

Serumproben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs können mit Reaktionspuffer verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diesen Verdünnungsfaktor bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*höchste Konzentration der Standardkurve  $\times$  anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

*analytische Sensitivität  $\times$  anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

### *Biotininterferenz*

Proben, die Biotin in einer Konzentration von  $\leq 400$  ng/ml enthalten, zeigen eine Veränderung der Ergebnisse von  $< 25$  %. Höhere Biotinkonzentrationen können zu

falschen Ergebnissen führen. Bei Patienten, die > 5 mg/Tag Biotin einnehmen, sollte die Probeentnahme frühestens 24 Stunden nach der letzten Applikation erfolgen. Ergebnisse für Patienten, die Biotinpräparate einnehmen oder eine hochdosierte Biotintherapie erhalten, sollten grundsätzlich vorsichtig und im Zusammenhang mit dem gesamten klinischen Bild interpretiert werden.

## 9. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### *Referenzwerte*

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich gesunden Personen (n = 40) wurde folgender Normbereich ermittelt:

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| Mittelwert:     | 160 ng/ml |
| 10. Perzentile: | 88 ng/ml  |
| 90. Perzentile: | 232 ng/ml |

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Genauigkeit – Präzision*

#### **Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 12**

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Kontrollproben unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

| Probe | Mittelwert [ng/ml] | VK [%] |
|-------|--------------------|--------|
| 1     | 48,1               | 5,2    |
| 2     | 107,1              | 8,1    |

#### **Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 15**

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 3 Serumproben unter variablen Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

| Probe | Mittelwert [ng/ml] | VK [%] |
|-------|--------------------|--------|
| 1     | 92,4               | 9,9    |
| 2     | 65,8               | 10,6   |
| 3     | 59,4               | 10,9   |

### Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 2 Serumproben wurden dafür mit bekannten Serotonin-Konzentrationen versetzt und gemessen.

| Probe [ng/ml] | Spike [ng/ml] | erwartet [ng/ml] | gemessen [ng/ml] | Wiederfindung [%] |
|---------------|---------------|------------------|------------------|-------------------|
| 98,7          | 25            | 123,7            | 129,4            | 104,6             |
|               | 50            | 148,7            | 153,9            | 103,5             |
|               | 100           | 198,7            | 180,8            | 91,0              |
| 72,8          | 25            | 97,8             | 102,3            | 104,6             |
|               | 50            | 122,8            | 120,4            | 98,1              |
|               | 100           | 172,8            | 168,1            | 97,3              |

### Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung von 4 Serumproben nachgewiesen.

Für Serotonin in Serum wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 17,7 bis 473,2 ng/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als  $\pm 20\%$ .

| Probe [ng/ml] | Verdünnung | erwartet [ng/ml] | gemessen [ng/ml] | Wiederfindung [%] |
|---------------|------------|------------------|------------------|-------------------|
| 70,6          | 1:2        | 35,3             | 36,0             | 102,1             |
|               | 1:3        | 23,5             | 22,5             | 95,6              |
|               | 1:4        | 17,7             | 16,3             | 92,4              |
| 109,1         | 1:2        | 54,6             | 58,6             | 107,4             |
|               | 1:3        | 36,4             | 38,4             | 105,5             |
|               | 1:4        | 27,3             | 24,5             | 89,9              |

|       |     |       |       |      |
|-------|-----|-------|-------|------|
| 368,8 | 1:2 | 184,4 | 167,4 | 90,8 |
|       | 1:3 | 122,9 | 112,6 | 91,6 |
|       | 1:4 | 92,2  | 86,6  | 94,0 |
| 473,2 | 1:2 | 236,6 | 226,1 | 95,6 |
|       | 1:3 | 157,7 | 143,7 | 91,1 |
|       | 1:4 | 118,3 | 111,3 | 94,1 |

### Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 - 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 81-mal der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 6,9 ng/ml.

### Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu verwandten Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die Serotonin-Reaktivität:

|                     |          |
|---------------------|----------|
| 3-Indolacrylsäure   | < 0,04 % |
| Indol-3-Pyruvat     | < 0,03 % |
| 3-Indolacetat       | < 0,05 % |
| 5-Methoxytryptophol | < 0,15 % |
| L-5-OH-Tryptophan   | < 0,21 % |

## 11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

**Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden

## 12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK®* ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller

festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immunodiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immunodiagnostik AG, zurückzusenden.

## 14. LITERATUR

1. Badawy, A. a-B. Tryptophan: the key to boosting brain serotonin synthesis in depressive illness. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* **27**, 878–93 (2013).
2. Gershon, M. D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **20**, 14–21 (2013).
3. Gershon, M. D. Serotonin is a sword and a shield of the bowel: serotonin plays offense and defense. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **123**, 268–80; discussion 280 (2012).
4. Namkung, J., Kim, H. & Park, S. Peripheral Serotonin: a New Player in Systemic Energy Homeostasis. *Molecules and Cells* **38**, 1–6 (2015).
5. Park, H.-J., Lee, S.-E., Oh, J.-H., Seo, K.-W. & Song, K.-H. Leptin, adiponectin and serotonin levels in lean and obese dogs. *BMC veterinary research* **10**, 113 (2014).
6. Reigstad, C. S., Salmonson, C. E., Rainey, J. F., Szurszewski, J. H., Linden, D. R., Sonnenburg, J. L., Farrugia, G. & Kashyap, P. C. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *The FASEB Journal* **29**, 1395–1403 (2015).

**Symbole:**

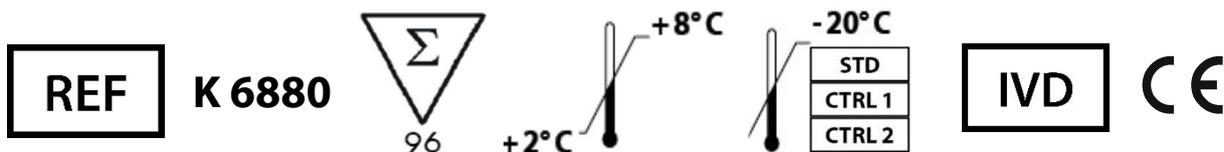
|  |   |  |                                       |
|--|---|--|---------------------------------------|
|   | Temperaturbegrenzung                          |   | Bestellnummer                         |
|   | In-Vitro-Diagnostikum                         |   | Zu verwenden mit                      |
|   | Hersteller                                    |   | Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen  |
|   | Chargenbezeichnung                            |   | Verwendbar bis                        |
|   | Enthält Plasmoderivate oder menschliches Blut |   | Gebrauchsanweisung beachten           |
|   | Spezifikationsdatenblatt beachten             |   | Nicht wiederverwenden                 |
|   | Herstellungskennung                           |   | Enthält Material tierischen Ursprungs |
|  | medizinische Substanz                         |  | Enthält Material humanen Ursprungs    |

**Manual**

# **IDK® Serotonin ELISA**

***For the in vitro determination of serotonin (5-HT) in human serum and dried blood spots***

Valid from 2023-11-07



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel: + 49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTENDED USE</b>                                  | <b>17</b> |
| <b>2. MATERIAL SUPPLIED</b>                             | <b>17</b> |
| <b>3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>            | <b>17</b> |
| <b>4. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>           | <b>18</b> |
| <b>5. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>            | <b>19</b> |
| <i>Serum samples</i>                                    | 19        |
| <i>Dried blood spots</i>                                | 19        |
| <b>6. ASSAY PROCEDURE</b>                               | <b>19</b> |
| <i>Principle of the test</i>                            | 19        |
| <i>Derivatisation procedure</i>                         | 20        |
| <i>Test procedure</i>                                   | 21        |
| <b>7. RESULTS</b>                                       | <b>22</b> |
| <b>8. LIMITATIONS</b>                                   | <b>23</b> |
| <i>Biotin interference</i>                              | 23        |
| <b>9. QUALITY CONTROL</b>                               | <b>23</b> |
| <i>Reference Range</i>                                  | 23        |
| <b>10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>                  | <b>24</b> |
| <i>Accuracy – Precision</i>                             | 24        |
| <i>Accuracy – Trueness</i>                              | 24        |
| <i>Linearity</i>  | 24        |
| <i>Analytical sensitivity</i>                           | 25        |
| <i>Analytical specificity</i>                           | 25        |
| <b>11. PRECAUTIONS</b>                                  | <b>26</b> |
| <b>12. TECHNICAL HINTS</b>                              | <b>26</b> |
| <b>13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b> | <b>26</b> |
| <b>14. REFERENCES</b>                                   | <b>27</b> |

## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is intended for the quantitative determination of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) in human serum and dried blood spots. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No.     | Label   | Kit components  | Quantity     |
|--------------|---------|---|--------------|
| K 6880       | PLATE   | Microtiter plate, pre-coated                                | 12 x 8 wells |
| K 6880       | STD     | Standards, ready-to-use<br>(0, 10, 30, 100, 250, 750 ng/ml) | 6 x 500 µl   |
| K 6880       | CTRL 1  | Control, ready-to-use<br>(see specification for range)      | 1 x 500 µl   |
| K 6880       | CTRL 2  | Control, ready-to-use<br>(see specification for range)      | 1 x 500 µl   |
| K 6880       | ACTSOL  | Activating solution, ready-to-use                           | 1 x 7 ml     |
| K 0001.C.100 | WASHBUF | Wash buffer concentrate, 10 x                               | 2 x 100 ml   |
| K 6880       | CONJ    | Conjugate, peroxidase-labelled,<br>ready-to-use             | 1 x 12 ml    |
| K 6880       | REABUF  | Reaction buffer, ready-to-use                               | 1 x 70 ml    |
| K 6880       | DER     | Derivatisation reagent, lyophilised                         | 1 x 100 mg   |
| K 0008.07    | DMSO    | Dimethylsulfoxide (DMSO)                                    | 1 x 7 ml     |
| K 6880       | AB      | Serotonin antibody, ready-to-use                            | 1 x 6 ml     |
| K 0002.15    | SUB     | Substrate (tetramethylbenzidine),<br>ready-to-use           | 1 x 15 ml    |
| K 0003.15    | STOP    | Stop solution, ready-to-use                                 | 1 x 15 ml    |

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

## 3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water\*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker

- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 6)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥18.2 MΩ cm).

#### 4. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF+ 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2-8 °C for 1 month**.
- Store **standards and controls (STD/CTRL)** frozen at **-20 °C**. They are stable at -20 °C until the expiry date stated on the label. Thaw before use in the test and mix well. Re-freeze standards and controls after use.
- **DMSO** crystallises at 2-8 °C. Before use, bring to room temperature to dissolve the crystals.
- The **lyophilised derivatisation reagent (DER)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**. Bring to room temperature before opening and reconstitute the DER (100 mg) with **6 ml DMSO**. Allow to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly with a vortex-mixer. **The derivatisation reagent** (reconstituted DER) **can be stored at 2-8 °C for 2 months**. Bring to room temperature before reuse. Please note: DMSO attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2-8 °C**.

## 5. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Serum samples*

Serum samples are stable for up to 48 hours at 2-8 °C. For longer storage, store samples frozen at -20 °C. As serotonin is sensitive to light, store samples in a cool and dark place after collection.

The serum samples are analysed **undiluted**.

For sample preparation, a derivatisation reagent for derivatisation of serotonin is added (see derivatisation procedure).

### *Dried blood spots*

#### **Collection and storage of dried blood spots**

**50 µl whole blood** dripped on a dried sample carrier cleared by Immundiagnostik AG are suitable as sample material after complete drying. The dried blood carriers must be pre-treated, we recommend DrySpot-ID for serotonin (catalogue number DZ9021ID Serotonin) as a dried blood carrier. The moistened cards are stable for 1 week at room temperature, protected from light. For longer storage, store at -20°C in a dry place.

#### **Preparation of the dried blood samples**

|    |  |
|----|--|
| 1. | Remove Filter from sampling device and put it in a labelled 1.5 ml polypropylene tube. |
| 2. | Add <b>50 µl activating solution</b> (ACTSOL) on the dried blood sample.               |
| 3. | Allow sample to stand for <b>15-30 min</b> at room temperature (15-30 °C).             |

For sample preparation, a derivatisation reagent for derivatisation of serotonin is added (see derivatisation procedure).

## 6. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed for the quantitative determination of serotonin in human serum and dried blood spots. The assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays.

The sample preparation includes the addition of a derivatisation reagent for serotonin derivatisation. Afterwards, the treated samples and the polyclonal serotonin antiserum are incubated in the wells of a microtiter plate coated with serotonin derivative (tracer). During the incubation period, the target serotonin in the sample competes with the tracer, immobilised on the wall of the microtiter wells, for the binding of the polyclonal antibodies.

During the second incubation step, a peroxidase-conjugated antibody is added to detect the anti-serotonin antibodies. After washing away the unbound components, tetramethylbenzidine (TMB) is added as a peroxidase substrate. Finally, the enzymatic reaction is terminated by an acidic stop solution. The colour changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in the photometer at 450 nm. The intensity of the yellow colour is inverse proportional to the serotonin concentration in the sample; this means, high serotonin concentration in the sample reduces the concentration of tracer-bound antibodies and lowers the photometric signal. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Serotonin, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

### *Derivatisation procedure*

Bring **all reagents and samples to room temperature** (15-30 °C) and mix well.

Derivatisation of standards, controls and samples is carried out in single analysis in vials (e.g. 1.5 ml polypropylene vials).

We recommend preparing one derivatisation per standard, control and sample and transferring it in duplicate determinations into the wells of the microtiter plate.

|    |  |
|----|--|
| 1. | Add <b>25 µl standard</b> (STD)/ <b>control</b> (CTRL)/ <b>serum sample</b> in the respective vials.   |
| 2. | Add <b>500 µl reaction buffer</b> (REABUF) into each vial (STD, CTRL, serum), as well as into the vials with the prepared dried blood samples.   |
| 3. | Add <b>50 µl derivatisation reagent</b> into each vial (STD, CTRL, serum, dried blood spot) and <b>mix thoroughly</b> for several seconds on a vortex mixer or by inversion.<br>Make sure the dry blood carriers are completely covered with liquid. |
| 4. | Incubate for <b>30 min</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .  |

2 x 50 µl of the derivatised standards, controls and samples are used in the ELISA as duplicates.

### Test procedure

Mark the positions of standards/controls/samples in duplicate on a protocol sheet. Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from the kit. Store unused strips covered with foil at 2-8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

|     |  |
|-----|--|
| 5.  | For the analysis in duplicate take <b>2 x 50 µl</b> of the <b>derivatised standards/controls/samples</b> out of the vials and add into the respective wells of the microtiter plate.   |
| 6.  | Add <b>50 µl serotonin antibody</b> (AB) into each well of the microtiter plate.   |
| 7.  | Cover the strips tightly with foil and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .   |
| 8.  | Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.  |
| 9.  | Add <b>100 µl conjugate</b> (CONJ) into each well.   |
| 10. | Cover the strips and incubate for <b>30 minutes</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .   |
| 11. | Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.  |
| 12. | Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.  |
| 13. | Incubate for <b>10-14 min*</b> at room temperature (15-30 °C) in the <b>dark</b> .   |
| 14. | Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.  |
| 15. | Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> against 620 nm (690 nm) as a reference. |

\* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. Attention should be paid to the following points:

Derivatisation of the samples is possible in 30 minutes on a horizontal shaker or, after thorough mixing, in 90 minutes without shaking in an automated processor. In automated processing, the volumes of samples and diluents may be scaled while maintaining the respective dilutions. Device-specific minimum and maximum volumes must be taken into account. The homogeneity of the resulting dilution must be ensured.

For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

## 7. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the 4 parameter algorithm.

### 1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

### 2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

### 3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a linear abscissa for concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the program used, the duplicate values should be evaluated manually.

### Serum

**No factor** is required.

### Dried blood spots

The obtained results have to be multiplied by the **factor of 2.3** to get the actual concentrations.

## 8. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range can be diluted with reaction buffer and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

*highest concentration of the standard curve × sample dilution factor to be used*

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

*analytical sensitivity × sample dilution factor to be used*

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

### *Biotin interference*

Samples containing a biotin concentration of  $\leq 400$  ng/ml show a change of the results of  $< 25$  %. Higher concentrations of biotin can lead to false results. Patients taking  $> 5$  mg biotin per day should wait at least 24 hours after taking biotin to have their samples collected. Results of patients taking biotin supplements or receiving a high-dose biotin therapy should generally be interpreted along with the total clinical picture.

## 9. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control samples are outside of the acceptable limits.

### *Reference Range*

Based on internal studies with samples from apparently healthy persons ( $n = 40$ ), the following normal range was estimated:

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| Mean value:                  | 160 ng/ml |
| 10 <sup>th</sup> percentile: | 88 ng/ml  |
| 90 <sup>th</sup> Percentile: | 232 ng/ml |

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 12**

The repeatability was assessed with 2 control samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

| sample | mean value [ng/ml] | CV [%] |
|--------|--------------------|--------|
| 1      | 48.1               | 5.2    |
| 2      | 107.1              | 8.1    |

#### **Reproducibility (Inter-Assay); n = 15**

The reproducibility was assessed with 3 serum samples under varying parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

| sample | mean value [ng/ml] | CV [%] |
|--------|--------------------|--------|
| 1      | 92.4               | 9.9    |
| 2      | 65.8               | 10.6   |
| 3      | 59.4               | 10.9   |

### *Accuracy – Trueness*

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, serotonin spikes with known concentrations were added to 2 different serum samples.

| sample [ng/ml] | spike [ng/ml] | expected [ng/ml] | obtained [ng/ml] | recovery [%] |
|----------------|---------------|------------------|------------------|--------------|
| 98.7           | 25            | 123.7            | 129.4            | 104.6        |
|                | 50            | 148.7            | 153.9            | 103.5        |
|                | 100           | 198.7            | 180.8            | 91.0         |
| 72.8           | 25            | 97.8             | 102.3            | 104.6        |
|                | 50            | 122.8            | 120.4            | 98.1         |
|                | 100           | 172.8            | 168.1            | 97.3         |

### *Linearity*

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed with a serial dilution of 4 serum samples.

For Serotonin in serum, the method has been demonstrated to be linear from 17.7 to 473.2 ng/ml, showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval.

| sample [ng/ml] | dilution | expected [ng/ml] | obtained [ng/ml] | recovery [%] |
|----------------|----------|------------------|------------------|--------------|
| 70.6           | 1:2      | 35.3             | 36.0             | 102.1        |
|                | 1:3      | 23.5             | 22.5             | 95.6         |
|                | 1:4      | 17.7             | 16.3             | 92.4         |
| 109.1          | 1:2      | 54.6             | 58.6             | 107.4        |
|                | 1:3      | 36.4             | 38.4             | 105.5        |
|                | 1:4      | 27.3             | 24.5             | 89.9         |
| 368.8          | 1:2      | 184.4            | 167.4            | 90.8         |
|                | 1:3      | 122.9            | 112.6            | 91.6         |
|                | 1:4      | 92.2             | 86.6             | 94.0         |
| 473.2          | 1:2      | 236.6            | 226.1            | 95.6         |
|                | 1:3      | 157.7            | 143.7            | 91.1         |
|                | 1:4      | 118.3            | 111.3            | 94.1         |

### *Analytical sensitivity*

The zero-standard was measured 81 times. The detection limit was set as  $B_0 - 2\text{ SD}$  and estimated to be 6.9 ng/ml.

### *Analytical specificity*

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to serotonin. The specificity is calculated in percent in relation to the serotonin-binding activity:

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| 3-Indoleacrylic acid  | < 0.04%  |
| Indole-3-pyruvic acid | < 0.03%  |
| 3-Indoleacetic acid   | < 0.05 % |
| 5-Methoxytryptophol   | < 0.15 % |
| L-5-OH-tryptophan     | < 0.21 % |

## 11. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

**Warning:** Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulfuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapour and avoid inhalation.

## 12. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

## 13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.

- IDK® is a trade mark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

## 14. REFERENCES

1. Badawy, A. a-B. Tryptophan: the key to boosting brain serotonin synthesis in depressive illness. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* **27**, 878–93 (2013).
2. Gershon, M. D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **20**, 14–21 (2013).
3. Gershon, M. D. Serotonin is a sword and a shield of the bowel: serotonin plays offense and defense. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **123**, 268–80; discussion 280 (2012).
4. Namkung, J., Kim, H. & Park, S. Peripheral Serotonin: a New Player in Systemic Energy Homeostasis. *Molecules and Cells* **38**, 1–6 (2015).
5. Park, H.-J., Lee, S.-E., Oh, J.-H., Seo, K.-W. & Song, K.-H. Leptin, adiponectin and serotonin levels in lean and obese dogs. *BMC veterinary research* **10**, 113 (2014).
6. Reigstad, C. S., Salmonson, C. E., Rainey, J. F., Szurszewski, J. H., Linden, D. R., Sonnenburg, J. L., Farrugia, G. & Kashyap, P. C. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *The FASEB Journal* **29**, 1395–1403 (2015).

**Symbols:**

|   |  |   |                                    |
|---|--|---|------------------------------------|
|    | Temperature limitation                     |    | Catalogue number                   |
|    | In Vitro Diagnostic Medical Device         |    | To be used with                    |
|    | Manufacturer                               |    | Contains sufficient for <n> tests  |
|    | Lot number                                 |    | Use by                             |
|    | Contains plasma derivatives or human blood |    | Consult instructions for use       |
|    | Consult specification data sheet           |    | Do not re-use                      |
|   | Unique Device Identification               |   | Contains material of animal origin |
|  | Medicinal substance                        |  | Contains material of human origin  |