

Product information



Information about other products is available at: www.demeditec.com



Serotonin ELISA



DEE8900



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

Table of contents

1.	Introduction	5
1.1	Intended use and principle of the test	5
1.2	Clinical application	5
2.	Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations	5
2.1	Procedural cautions, guidelines and warnings	5
2.2	Limitations	5
2.2.1	Interfering substances and proper handling of specimens	6
2.2.2	Drug and food interferences	6
2.2.3	High-Dose-Hook effect	6
3.	Storage and stability	6
4.	Materials	6
4.1	Contents of the kit	6
4.2	Calibration and Controls	7
4.3	Additional materials required but not provided in the kit	8
4.4	Additional equipment required but not provided in the kit	8
5.	Sample collection, handling and storage	8
6.	Test procedure	8
6.1	Preparation of reagents and further notes	9
6.2	Preparation of samples – Acylation	9
6.3	Serotonin ELISA	9
7.	Calculation of results	9
7.1	Expected reference value	10
7.2	Typical standard curve	10
8.	Control samples	11
9.	Assay characteristics	11
9.1	Performance data	11
9.2	Metrological Traceability	12
10.	References/Literature	13
11.	Changes	13

1.	Einleitung	14
1.1	Verwendungszweck und Testprinzip	14
1.2	Klinische Anwendung	14
2.	Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen	14
2.1	Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen	14
2.2	Grenzen des Tests	14
2.2.1	Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben	15
2.2.2	Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel	15
2.2.3	High-Dose-Hook Effekt	16
3.	Lagerung und Haltbarkeit	16
4.	Materialien	16
4.1	Reagenzien im Kit	16
4.2	Kalibratoren und Kontrollen	17
4.3	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien	17
4.4	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte	17
5.	Probensammlung, -behandlung und -lagerung	17
6.	Testdurchführung	18
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise	18
6.2	Probenvorbereitung – Azylierung	18
6.3	Serotonin ELISA	19
7.	Berechnung der Ergebnisse	19
7.1	Erwartete Referenzbereiche	19
7.2	Typische Standardkurve	20
8.	Kontrollproben	20
9.	Assaycharakteristika	20
9.1	Leistungsdaten	20
9.2	Metrologische Rückführbarkeit	22
10.	Referenzen/Literatur	22
11.	Änderungen	23

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	24
1.1	USO PREVISTO Y PRINCIPIO DE LA PRUEBA	24
1.2	APLICACIÓN CLÍNICA	24
2.	PRECAUCIONES, DIRECTRICES, ADVERTENCIAS Y LIMITACIONES DE PROCEDIMIENTO	24
2.1	PRECAUCIONES, DIRECTRICES Y ADVERTENCIAS PROCESALES	24
2.2	LIMITACIONES	25
2.2.1	SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN Y MANIPULACIÓN ADECUADA DE LAS MUESTRAS	25
2.2.2	INTERFERENCIAS DE MEDICAMENTOS Y ALIMENTOS	25
2.2.3	EFFECTO GANCHO DE DOSIS ALTA	26
3.	ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD	26
4.	MATERIALES	26
4.1	CONTENIDO DEL KIT	26
4.2	CALIBRACIÓN Y CONTROLES	27
4.3	MATERIALES ADICIONALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS EN EL KIT	27
4.4	EQUIPO ADICIONAL REQUERIDO PERO NO INCLUIDO EN EL KIT	27
5.	RECOGIDA, MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS	27
6.	PROCEDIMIENTO DE PRUEBA	28
6.1	PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y NOTAS ADICIONALES	28
6.2	PREPARACIÓN DE MUESTRAS – ACILACIÓN	28
6.3	SEROTONIN ELISA	29
7.	CÁLCULO DE RESULTADOS	29
7.1	VALOR DE REFERENCIA ESPERADO	30
7.2	CURVA ESTÁNDAR TÍPICA	30
8.	MUESTRAS DE CONTROL	30
9.	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	31
9.1	DATOS DE RENDIMIENTO	31
9.2	TRAZABILIDAD METROLÓGICA	32
10.	REFERENCIAS/LITERATURA	33
11.	CAMBIOS	33
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	36

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 assessment 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 uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The acylated standards, controls and samples compete with the solid phase bound analytes for a fixed number of antibody binding sites. After the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antibody 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 resulting in a colour reaction. The reaction is monitored at a wavelength of 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standard concentrations. Manual processing of the ELISA 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 [1], a well-studied neurotransmitter, and may also act as a peripheral hormone [2]. Synthesis occurs mainly in enterochromaffin cells (ec-cells) of the gastrointestinal tract and in neurons [1, 3]. It is present in high concentrations in ec-cells of the intestine, serotonergic neurons of the brain, and platelets [1, 3-6]. Serotonin is mainly degraded to 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) or melatonin [1, 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 [1, 10, 11]. 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 [2, 12, 13], or hepatocellular carcinomas [14].

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone, even if these results are assessed in accordance with the quality criteria of the method. 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.

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) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) If serious incidents should occur in connection with this product, they should be reported to the manufacturer and the competent national authorities.
- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 – 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided. Microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up.
- (8) Standards, Controls and specimen samples should be assayed in duplicate.
- (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) 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.
- (16) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.
- (17) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (18) 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.
- (19) 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, methyl dopa, promethazine, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), or streptozocin may result in decreased serotonin levels.

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

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

Store kit and reagents at 2 – 8 °C until expiration date. Do not use kit and components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened, the reagents are stable for 2 months when stored at 2 – 8 °C. Once the resealable pouch of the ELISA plate has been opened, care should be taken to close it tightly again including the desiccant.

4. Materials

4.1 Contents of the kit

BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate – concentrated 50x
------------------	-----------------------------	---

Content: Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH

Volume: 1 x 20 ml/vial, purple cap

BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate – ready to use
Content:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
Description:	Species is goat	
Hazard pictograms:		
	GHS07	
Signal word:	Warning	
Hazardous ingredients:	2-methyl-2H-isothiazol-3-one	
Hazard statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.	
Precautionary statements:	P280 Wear protective gloves. P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate – ready to use
Content:	Chromogenic substrate containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 ml/vial, black cap	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution – ready to use
Content:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 ml/vial, grey cap	
BA E-0931	 SER 5-HIAA	Serotonin Microtiter Strips – ready to use
Content:	1 x 96 wells (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable white pouch with desiccant	
BA E-6612	ACYL-REAG	Acylation Reagent – ready to use
Content:	Acylation reagent in DMSO	
Volume:	2 x 3 ml/vial, white cap	
BA E-8910	SER-AS	Serotonin Antiserum – ready to use
Content:	Rabbit anti-Serotonin antibody, blue coloured	
Volume:	1 x 6 ml/vial, blue cap	
Description:	Species is rabbit	
BA E-8911	ACYL-BUFF	Acylation Buffer – ready to use
Content:	TRIS buffer with non-mercury preservative	
Volume:	1 x 55 ml/vial, grey cap	

4.2 Calibration and Controls

Standards and Controls – ready to use

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

BA R-8952	CONTROL 2	red	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range.	4 ml
Conversion:	serotonin [ng/ml] x 5.67 = serotonin [nmol/l]			
Content:	TRIS buffer with non-mercury preservatives, spiked with a defined quantity of serotonin			

4.3 Additional materials required but not provided in the kit

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

4.4 Additional equipment required but not provided in the kit

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

5. Sample collection, handling and storage

Serum

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

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

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

Repeated freezing and thawing should be avoided.

Always store samples protected from light.

Urine

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

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

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

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

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

Repeated freezing and thawing should be avoided.

6. Test procedure

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

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

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

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

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

6.1 Preparation of reagents and further notes

Wash Buffer

Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate **WASH-CONC** **50x** with water to a final volume of 1000 ml.

Storage: 2 months at 2 – 8 °C

Serotonin Microtiter Strips

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

Acylation Reagent

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

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

6.2 Preparation of samples – Acylation

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

6.3 Serotonin ELISA

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

7. Calculation of results

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

The standard curve, which can be used to determine the concentration of the unknown samples, 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 have to 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. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

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

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

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

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

Conversion:

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

7.1 Expected reference value

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

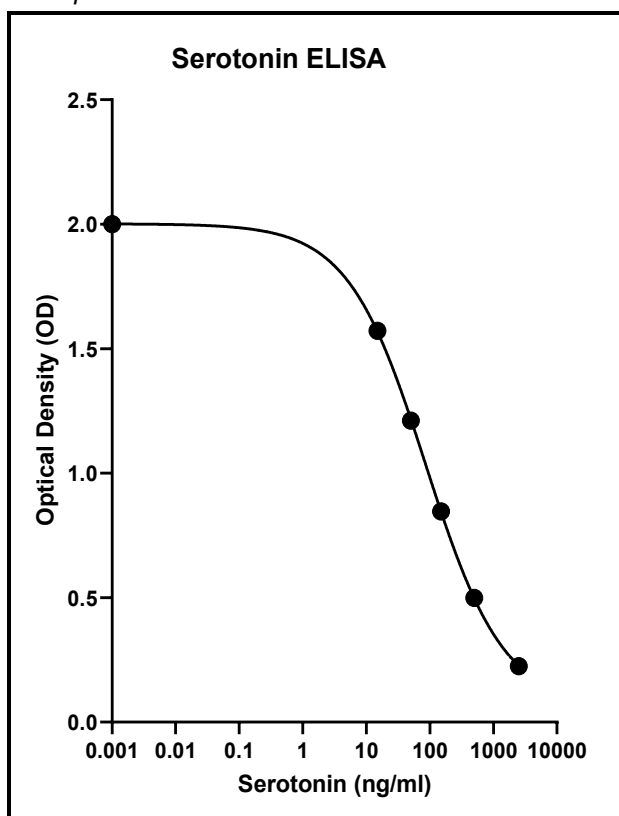
As a basis for the internal reference range determination, the following number of samples for the respective parameters was considered: 24-hour urine n = 194, spontaneous urine (second morning urine) n = 81, serum n = 80. Expected reference ranges were determined in an internal study by testing samples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

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

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

7.2 Typical standard curve

⚠ *Example: Do not use for calculation!*



8. Control samples

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 indicated on the QC-Report.

9. Assay characteristics

9.1 Performance data

Analytical sensitivity was determined according to the CLSI Standard EP17-A2 Vol. 32 No. 8. For the determination of the analytical sensitivity, 5 blank samples and 5 low level samples in 2 kit lots in 4 replicates per sample were determined. This resulted in 60 results blank and 60 results low level per lot.

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

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

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

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

Lot-to-Lot			
	Sample	Mean $\pm$ SD [ng/ml]	CV [%]
Serotonin in urine (n = 6)	1	103 $\pm$ 6.5	6.4
	2	734 $\pm$ 63.3	8.6
Serotonin in serum (n = 6)	1	97.6 $\pm$ 7.9	8.1
	2	790 $\pm$ 62.3	7.9

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

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

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

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

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

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

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

9.2 Metrological Traceability

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

Standards and Controls	Uncertainty [%]
	2.5%

Serotonin ELISA		
Serum	Concentration [ng/ml]	Expanded Uncertainty [%] $k = 2^*$
	61.6	25.5
	227	20.8
Urine	Concentration [ng/ml]	Expanded Uncertainty [%] $k = 2^*$
	18.1	44.5
	55.2	23.9
	153	19.6
	240	18.9
	498	18.5
	1,798	25.1

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

10. References/Literature

1. 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.
2. 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.
3. 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).
4. Bieger, W.P., *NeuroStress Guide*. 2011.
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.

11. Changes

Version	Release Date	Chapter	Change
17.1	2022-06-14	All	- Assay Revision due to IVDR regulation (EU) 2017/746. Due to this revision all chapters were revised and changed.
18.0	2023-03-20	7.1	- Sentence: "Values significantly outside the reference range should be assessed by a doctor." added
19.0	2023-09-07	4.1 9.1	- Hazard labelling updated according to SDS - Lot-to-Lot updated
20.0	2025-04-25	2.1 4.1 7 9.2	- Updated - Hazard labelling updated according to SDS - Note added to the dilution factor in the calculation - Metrological Traceability updated

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 der Mikrotiterplatte gebunden. Die acylierten Standards, Kontrollen und Proben und die an die Festphase gebundenen Analyten konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörperkomplexe durch Waschen entfernt. Der an die feste Phase gebundene Antikörper wird mit einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen-Antikörper gebunden und mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die Konzentrationen der unbekannten Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen und Abgleich der gemessenen Absorptionen ermittelt. Die manuelle Abarbeitung des ELISAs 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 [1], ein gut untersuchter Neurotransmitter und kann auch als peripheres Hormon wirken [2]. Die Synthese findet hauptsächlich in den enterochromaffinen Zellen (EC-Zellen) des Gastrointestinaltraktes und in Neuronen statt [1, 3]. In hohen Konzentrationen liegt es in den EC-Zellen des Darms, den serotonergen Neuronen des Gehirns und in Thrombozyten vor [1, 3-6]. Serotonin wird hauptsächlich zu 5-Hydroxyindol-Essigsäure (5-HIAA) oder Melatonin abgebaut [1, 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 [1, 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 [2, 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.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

- (1) Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Gebrauchsanweisung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter Verwendungszweck (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (4) Geeignete persönliche Schutzausrüstung (Kittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille) ist zu tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Falls in Zusammenhang mit diesem Produkt schwerwiegende Vorfälle auftreten sollten, sollen diese dem Hersteller und den zuständigen nationalen Behörden gemeldet werden.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Verwenden Sie für Verdünnungs- oder Rekonstitutionszwecke deionisiertes, destilliertes oder ultrareines Wasser. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über einzeln herausnehmbare und abbrechbare Streifen. Ungenutzte Wells müssen bei 2 – 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und

- im mitgelieferten Rahmen verwendet werden. Die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden.
- (8) Standards, Kontrollen und 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) 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.
 - (16) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potentiell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
 - (17) Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
 - (18) 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.
 - (19) 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, Ephedrin, Guaifenesin, Mephensesin (carbamate), Methocarbamol, Monoaminoxidase-Hemmer (MAO-Hemmer), Paracetamol, Phenacetin, Phenobarbital, Phentolamin oder Reserpin zu erhöhten Serotoninwerten führen. Acetylsalicylsäure, Chlorpromazin, Isoniazid, Levodopa, Methenamin, Methyldopa, Promethazin, selektive Serotonin-

Wiederaufnahmehemmer (SSRIs) oder Streptozocin hingegen können zu verringerten Serotoninwerten führen.

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

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Assay nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

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

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA E-0030	WASH-CONC 50x	Waschpufferkonzentrat – 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel lila	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzymkonjugat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Ziege anti-Kaninchen Immunglobuline, konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot	
Beschreibung:	Spezies ist Ziege	
Gefahrenpiktogramme:		
	GHS07	
Signalwort:	Achtung	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	2-Methyl-2H-isothiazol-3-on	
Gefahrenhinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.	
Sicherheitshinweise:	P280 Schutzhandschuhe tragen. P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stopplösung – gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel grau	
BA E-0931	SER 5-HIAA	Serotonin Mikrotiterstreifen – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Wells (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem weißen wiederverschließbaren Beutel	
BA E-6612	ACYL-REAG	Azylierungsreagenz – gebrauchsfertig
Inhalt:	Azylierungsreagenz in DMSO	
Volumen:	2 x 3 ml/Fläschchen, Deckel weiß	
BA E-8910	SER-AS	Serotonin Antiserum – gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen anti-Serotonin Antikörper, blau gefärbt	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau	

Beschreibung: Spezies ist Kaninchen

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

Inhalt: TRIS-Puffer mit quecksilberfreien Konservierungsmitteln

Volumen: 1 x 55 ml/Fläschchen, Deckel grau

4.2 Kalibratoren und Kontrollen

Standards and Kontrollen – gebrauchsfertig

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

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

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

4.3 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien

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

4.4 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte

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

5. Probensammlung, -behandlung und -lagerung

Serum

Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation (nach Angaben des Herstellers) abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Der Serumserotoninspiegel kann im Tagesverlauf schwanken. Es sollte daher immer am gleichen Tageszeitpunkt die Blutabnahme erfolgen.

Ein traumatischer Gefäßzugang kann die Serotoninwerte drastisch erhöhen.

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

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

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Proben immer lichtgeschützt lagern.

Urin

24-Stunden Urinproben sowie Spontanurin (zweiter Morgenurin) können zur Analyse verwendet werden.

24-Stunden Urin: über einen definierten Zeitraum von 24 Stunden wird sämtlicher Urin in einem Gefäß mit vorgelegter Säure (10 – 15 ml 100% Essigsäure) zur Stabilisierung gesammelt und das

Gesamtvolumen für die spätere Auswertung der Ergebnisse notiert. Während der Sammelperiode ist das gesammelte Probenmaterial stets kühl und lichtgeschützt zu lagern (2 – 8 °C).

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

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

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

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Reaktionsröhrchen und Mikrotiterplatten müssen beschriftet werden (die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden). Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.

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

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

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

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

6.1 Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise

Waschpuffer

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

Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

Serotonin Mikrotiterstreifen

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

Azylierungsreagenz

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

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

6.2 Probenvorbereitung – Azylierung

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

6.3 Serotonin ELISA

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

7. Berechnung der Ergebnisse

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

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannten Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standardabsorptionen (Berechnung der mittleren Absorption, linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) mit einer Konzentration von 0,001 ng/ml für Standard A (diese Ausrichtung ist aufgrund der logarithmischen Darstellung der Daten erforderlich) erstellt. 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 und nochmals bestimmt werden. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt 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:

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

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.

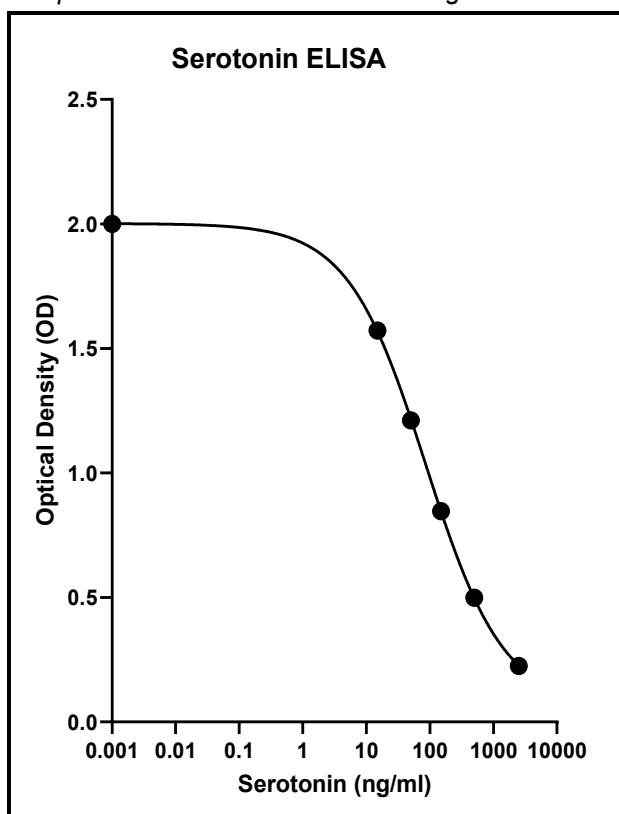
Als Grundlage für die interne Referenzbereichsbestimmung wurde folgende Probenanzahl für die jeweiligen Parameter berücksichtigt: 24h Sammelurin n = 194, Spontanurin (2. Morgenurin) n = 81, Serum n = 80. Die erwarteten Referenzbereiche wurden in einer internen Studie durch die Untersuchung von Proben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

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

Deutlich außerhalb des Referenzbereichs liegende Werte sollen ärztlich bewertet werden.

7.2 Typische Standardkurve

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



8. Kontrollproben

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen Vorschriften zu verwenden. Verwenden Sie Kontrollen im normalen und pathologischen Bereich. Kommerzielle Kontrollproben müssen dabei wie die unbekannten Proben behandelt werden. Kontrollproben sollten innerhalb der Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report angegeben.

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

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

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

Lot-zu-Lot			
	Probe	Mittelwert ± SD [ng/ml]	CV [%]
Serotonin in Urin (n = 6)	1	103 ± 6,5	6,4
	2	734 ± 63,3	8,6
Serotonin in Serum (n = 6)	1	97,6 ± 7,9	8,1
	2	790 ± 62,3	7,9

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

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

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

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

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

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	$y = 0,9x - 20,7$; $R^2 = 0,988$; $n = 97$

9.2 Metrologische Rückführbarkeit

Die Standards und Kontrollen des Serotonin ELISA zugewiesenen Werte sind durch Wägung mit qualitätskontrollierten Analyten auf SI-Einheiten rückführbar.

Standards und Kontrollen	Unsicherheit [%]
	2,5

Serotonin ELISA		
Serum	Konzentration [ng/ml]	Erweiterte Unsicherheit [%] $k = 2^*$
	61,6	25,5
	227	20,8
Urin	Konzentration [ng/ml]	Erweiterte Unsicherheit [%] $k = 2^*$
	18,1	44,7
	55,2	23,9
	153	19,6
	240	18,9
	498	18,5
	1.798	25,1

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

10. Referenzen/Literatur

1. 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.
2. 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.
3. 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).
4. Bieger, W.P., *NeuroStress Guide*. 2011.
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.

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

11. Änderungen

Version	Freigabedatum	Kapitel	Änderung
17.1	2022-06-14	Alle	- Assay Revision aufgrund IVDR-Verordnung (EU) 2017/746. Aufgrund dieser Revision sind alle Kapitel überarbeitet und geändert worden.
18.0	2023-03-20	7.1	- Satz: „Deutlich außerhalb des Referenzbereichs liegende Werte sollen ärztlich bewertet werden.“ hinzugefügt
19.0	2023-09-07	4.1 9.1	- Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert - Lot-zu-Lot aktualisiert
20.0	2025-4-25	2.1 4.1 7 9.2	- Aktualisiert - Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert - Anmerkung zum Verdünnungsfaktor bei der Berechnung hinzugefügt - Metrologische Rückführbarkeit aktualisiert

1. Introducción

1.1 Uso previsto y principio de la prueba

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de serotonina en orina y suero, para evaluar la homeostasis de la serotonina. La determinación de serotonina en orina es útil para la evaluación del estrés neuronal.

La determinación cuantitativa de la serotonina sigue los principios básicos del inmunoensayo enzimático. En el primer paso, la serotonina se acilada cuantitativamente. El ELISA competitivo posterior utiliza el formato de placa de microtitulación. El antígeno se une a la fase sólida de la placa de microtitulación. Los estándares, controles y muestras acilados compiten con los analitos unidos a la fase sólida por un número fijo de sitios de unión del anticuerpo. Una vez que el sistema está en equilibrio, el antígeno libre y los complejos antígeno-anticuerpo libres se eliminan mediante lavado. El anticuerpo unido a la fase sólida se detecta mediante un conjugado IgG-peroxidasa anti-conejo utilizando TMB como sustrato, lo que da lugar a una reacción de color. La reacción se controla a una longitud de onda de 450 nm.

La cuantificación de muestras desconocidas se logra comparando su absorbancia con una curva de referencia preparada con concentraciones estándar conocidas. Se recomienda el procesamiento manual del ELISA. El uso de equipos automáticos de laboratorio es responsabilidad del usuario. Este diagnóstico in vitro es sólo para uso profesional.

1.2 Aplicación clínica

La serotonina (5-hidroxitriptamina) es un producto intermedio del metabolismo del triptófano [1], un neurotransmisor bien estudiado y también puede actuar como hormona periférica [2]. La síntesis se produce principalmente en las células enterocromafines (células-ec) del tracto gastrointestinal y en las neuronas [1, 3]. Está presente en altas concentraciones en las células ce del intestino, las neuronas serotoninérgicas del cerebro y las plaquetas [1, 3 – 6]. La serotonina se degrada principalmente a ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) o melatonina [1, 7] y puede excretarse en la orina [8]. En el torrente sanguíneo, la gran mayoría de la serotonina se encuentra en las plaquetas [9] y puede detectarse fácilmente en el suero [1, 10, 11]. Los niveles alterados de serotonina en suero y/u orina pueden indicar disfunción tanto física como psicológica.

El equilibrio de serotonina puede verse alterado en suero y/u orina en diversas condiciones. Por ejemplo, se ha demostrado una disminución de los niveles de serotonina en la depresión, la ansiedad e incluso la sensibilidad al dolor en comparación con sujetos no afectados [6, 8, 10]. Por otro lado, se han informado niveles elevados de serotonina en pacientes con tumores neuroendocrinos secretores de serotonina, también llamados tumores carcinoides [2, 12, 13] o carcinomas hepatocelulares [14].

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse únicamente en los resultados de laboratorio, aunque estos resultados se evalúen de acuerdo con los criterios de calidad del método. Cualquier resultado de laboratorio es sólo una parte del cuadro clínico total del paciente.

Sólo en los casos en que los resultados de laboratorio concuerden aceptablemente con el cuadro clínico general del paciente, se puede utilizar para consecuencias terapéuticas.

2. Precauciones, directrices, advertencias y limitaciones de procedimiento

2.1 Precauciones, directrices y advertencias procesales

- (20) Este kit está destinado únicamente a uso profesional. Los usuarios deben tener un conocimiento profundo de este protocolo para el uso exitoso de este kit. Sólo las instrucciones de prueba proporcionadas con el kit son válidas y deben usarse para ejecutar el ensayo. Sólo se logrará un rendimiento confiable mediante el cumplimiento estricto y cuidadoso de las instrucciones proporcionadas.
- (21) Este ensayo fue validado para un determinado tipo de muestra cómo se indica en el Uso previsto (consulte el Capítulo 1). Cualquier uso no autorizado de este kit es responsabilidad del usuario y el fabricante no se hace responsable.
- (22) Deben seguirse los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).
- (23) Para reducir la exposición a sustancias potencialmente nocivas, llevar batas de laboratorio, guantes de protección desechables y gafas protectoras cuando sea necesario.
- (24) Si se produjeran incidentes graves en relación con este producto, se debería informar al fabricante y a las autoridades nacionales competentes.
- (25) Todos los reactivos y muestras del kit deben llevarse a temperatura ambiente y mezclarse suavemente, pero a fondo antes de su uso. Para fines de dilución o reconstitución, utilice agua desionizada, destilada o ultrapura. Evite la congelación y descongelación repetidas de reactivos y muestras.
- (26) La microplaca contiene tiras separables. Los pocillos no utilizados deben almacenarse entre 2 y 8 °C en la bolsa de aluminio sellada con desecante y usarse en el marco provisto. Las tiras

de microtitulación que se retiran del marco para su uso deben marcarse en consecuencia para evitar cualquier confusión.

- (27) Las normas, los controles y las muestras deben analizarse por duplicado.
- (28) Una vez iniciada la prueba, todos los pasos deben completarse sin interrupción. Asegúrese de que los reactivos, materiales y dispositivos necesarios estén preparados para su uso en el momento adecuado.
- (29) Los tiempos de incubación influyen en los resultados. Todos los pozos deben manipularse en el mismo orden e intervalos de tiempo.
- (30) Para evitar la contaminación cruzada de los reactivos, utilice puntas de pipeta desechables nuevas para dispensar cada reactivo, muestra, estándar y control.
- (31) Se debe establecer una curva estándar para cada ejecución.
- (32) Los controles deben incluirse en cada análisis y estar dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza se enumeran en el informe de control de calidad proporcionado con el kit.
- (33) No mezcle componentes del kit con diferentes números de lote dentro de una prueba y no utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad que se muestra en las etiquetas del kit.
- (34) Para obtener información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit, consulte la Hoja de datos de seguridad (SDS). La Ficha de Datos de Seguridad de este producto está disponible directamente en el sitio web del fabricante o previa solicitud.
- (35) Los reactivos del kit deben considerarse residuos peligrosos y eliminarse de acuerdo con las normativas nacionales.
- (36) Los valores de referencia esperados informados en esta instrucción de prueba son solo indicativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.
- (37) En caso de daños graves en el kit de prueba o en sus componentes, se deberá informar al fabricante por escrito, a más tardar, una semana después de recibir el kit. No se deben utilizar componentes individuales muy dañados para una prueba de funcionamiento. Deben almacenarse adecuadamente hasta que el fabricante decida qué hacer con ellos. Si se decide que ya no son aptos para las mediciones, deben eliminarse de acuerdo con las normas nacionales.
- (38) Los resultados obtenidos con este kit de prueba no deben tomarse como el único motivo de ninguna consecuencia terapéutica, sino que deben correlacionarse con otras pruebas de diagnóstico y observaciones clínicas.

2.2 Limitaciones

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificación de esta prueba podría influir en los resultados.

Si tiene más preguntas, comuníquese con el fabricante.

2.2.1 Sustancias que interfieren y manipulación adecuada de las muestras

Orina

¡Tenga en cuenta la colección de muestras! No se puede excluir que altas concentraciones de ácido conduzcan a resultados incorrectos. Hasta 30 µl de ácido acético al 100% por 1 ml de orina no se observó influencia en los resultados.

Suero

Las muestras que contienen precipitados o hebras de fibrina pueden provocar resultados inexactos.

Las muestras hemolíticas (hasta 2 mg/ml de hemoglobina), las muestras ictericas (hasta 50 mg/dl de bilirrubina) y las muestras lipémicas (hasta 834 mg/dl de triglicéridos) no influyen en los resultados del ensayo.

Si no se pueden estimar las concentraciones y existen dudas sobre si se cumplen los valores límite anteriores para muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas, las muestras no se deben utilizar en el ensayo.

2.2.2 Interferencias de medicamentos y alimentos

Los siguientes alimentos y estimulantes pueden afectar el contenido de serotonina en la muestra. Alcohol, piña, berenjena, aguacates, plátanos, pomelos, grosellas, cacao, kiwis, cafeína, melones, mirabeles, nicotina, nueces, melocotones, ciruelas, chocolate, grosellas, tomates, nueces.

Algunas drogas también pueden afectar los niveles de serotonina en la muestra. Por ejemplo, tomar anfetaminas, acetanilida, cumarinas, efedrina, guaifenesina, mefenesina (carbamato), metocarbamol, inhibidores de la monoaminooxidasa (inhibidores de la MAO), paracetamol, fenacetina, fenobarbital, fentolamina o reserpina puede provocar un aumento de los niveles de serotonina. Por el contrario, el ácido acetilsalicílico, la clorpromazina, la isoniazida, la levodopa, la metenamina, la metildopa, la

prometazina, los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) o la estreptozocina pueden provocar una disminución de los niveles de serotonina.

Por lo tanto, de 2 a 4 días antes de la recolección de la muestra, se deben evitar estos alimentos y suspender los medicamentos si es médicamente justificable.

2.2.3 Efecto gancho de dosis alta

En esta prueba no se observó ningún efecto gancho.

3. Almacenamiento y estabilidad

Almacenar el kit y los reactivos entre 2 y 8 °C hasta la fecha de vencimiento. No utilice el kit ni sus componentes después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del kit. Una vez abiertos, los reactivos son estables durante 2 meses si se almacenan entre 2 y 8 °C. Una vez abierta la bolsa resellable de la placa ELISA, hay que tener cuidado de volver a cerrarla herméticamente incluyendo el desecante.

4. Materiales

4.1 Contenido del kit

BA E-0030	WASH-CONC 50x	Tampón de lavado concentrado – concentrado 50x
Contenido:	Tampón con detergente no iónico y pH fisiológico	
Volumen:	1 x 20 ml/vial, tapa morada	
BA E-0040	CONJUGATE	Conjugado enzimático – listo para usar
Contenido:	Inmuglobulinas anticonejo de cabra conjugadas con peroxidasa	
Volumen:	1 x 12 ml/vial, tapa roja	
Descripción:	La especie es cabra	
Identificación de peligros:	 GHS07	
Palabra clave:	Advertencia	
Ingredientes peligrosos:	2-metil-2H-isotiazol-3-ona	
Declaraciones de peligro:	H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel..	
Consejos de precaución:	P280 Utilizar guantes de protección. P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua. P333+P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Acudir a un médico. P501 Eliminar el contenido/recipiente en un punto de recogida de residuos autorizado.	
BA E-0055	SUBSTRATE	Sustrato – listo para usar
Contenido:	Sustrato cromogénico que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, tampón de sustrato y peróxido de hidrógeno.	
Volumen:	1 x 12 ml/vial, tapa negra	
BA E-0080	STOP-SOLN	Solución de paro – listo para usar
Contenido:	Ácido sulfúrico 0,25 M	
Volumen:	1 x 12 ml/vial, tapa gris	
BA E-0931	LI SER 5-HIAA	Microplaca con tiras de Serotonina – listo para usar
Contenido:	1 placa de micropocillos de 96 pocillos (12x8) precubierta de antígeno en una bolsa blanca resellable con desecante	
BA E-6612	ACYL-REAG	Reactivo de Acilación – listo para usar
Contenido:	Reactivo de acilación en DMSO	
Volumen:	2 x 3 ml/vial, tapa blanca	

BA E-8910	SER-AS	Antisuero de Serotonina – listo para usar
Contenido:	Anticuerpo antiserotonina de conejo, de color azul.	
Volumen:	1 x 6 ml/vial, tapa azul	
Descripción:	La especie es conejo.	
BA E-8911	ACYL-BUFF	Tampón de Acilación – listo para usar
Contenido:	Tampón TRIS con conservante sin mercurio	
Volumen:	1 x 55 ml/vial, tapa gris	

4.2 Calibración y controles

Estándares y controles – listo para usar

Cat. no.	Componente	Color/Tapa	Concentración [ng/ml] (=µg/l)	Concentración[nmol/l]	Volumen/ Vial
BA R-8901	STANDARD A	blanco	0	0	4 ml
BA R-8902	STANDARD B	amarillo	15	85	4 ml
BA R-8903	STANDARD C	naranja	50	284	4 ml
BA R-8904	STANDARD D	azul	150	851	4 ml
BA R-8905	STANDARD E	gris	500	2,840	4 ml
BA R-8906	STANDARD F	negro	2,500	14,175	4 ml
BA R-8951	CONTROL 1	verde	¡Consulte el informe de control de calidad para conocer el valor esperado y el rango aceptable!		4 ml
BA R-8952	CONTROL 2	rojo			4 ml
Conversión:	serotonina [ng/ml] x 5,67 = serotonina [nmol/l]				
Contenido:	Tampón TRIS con conservantes sin mercurio, enriquecido con una cantidad definida de serotonina				

4.3 Materiales adicionales necesarios pero no incluidos en el kit

- Agua (desionizada, destilada o ultrapura)
- Material absorbente (toalla de papel)
- Tubos de reacción, al menos 3 ml, polipropileno/poliestireno

4.4 Equipo adicional requerido pero no incluido en el kit.

- Pipetas de precisión calibradas para dispensar volúmenes entre 20 y 500 µl
- Dispositivo de lavado de placas de microtitulación (manual, semiautomático o automatizado)
- Lector ELISA capaz de leer absorbancia a 450 nm y si es posible 620 – 650 nm
- Agitador de placas de microtitulación (amplitud de agitación 3 mm; aprox. 600 rpm)
- Mezclador Vortex

5. Recogida, manipulación y almacenamiento de muestras

Suero

Recoja la sangre mediante punción venosa, déjela coagular y separe el suero mediante centrifugación según las instrucciones del fabricante a temperatura ambiente. No centrifugar antes de que se haya producido la coagulación completa. Los pacientes que reciben terapia anticoagulante pueden requerir un mayor tiempo de coagulación. Los niveles séricos de serotonina pueden fluctuar a lo largo del día. Por lo tanto, la muestra de sangre siempre debe tomarse a la misma hora del día. El acceso vascular traumático puede aumentar drásticamente los niveles de serotonina.

En caso de duda, se recomienda no utilizar muestras hemolíticas, ictericas y lipémicas en el ensayo (ver 2.2.1).

Almacenamiento: hasta 1 día a 18 – 25 °C; hasta 3 días a 2 – 8 °C; almacenamiento durante un período más largo (hasta 6 meses) a -20 °C.

Se debe evitar la congelación y descongelación repetidas.

Almacene siempre las muestras protegidas de la luz.

Orina

Para el análisis se pueden utilizar muestras de orina de 24 horas, así como orina espontánea (segunda orina de la mañana).

Orina de 24 horas: Durante un período definido de 24 horas, toda la orina se recoge en un frasco con ácido (10 – 15 ml de ácido acético al 100%) previsto para la estabilización y se anota el volumen total para la evaluación de los resultados. Durante el período de recogida, la muestra recogida siempre debe almacenarse en un lugar fresco y protegido de la luz (2 – 8 °C).

Orina espontánea (segunda orina de la mañana): se puede utilizar estabilizada con 10 µl de ácido acético al 100% por 1 ml de muestra de orina. Almacene siempre las muestras protegidas de la luz. Se requiere una determinación de creatinina para la normalización.

Al estabilizar la orina, considere la acidez (ver 2.2.1).

Almacenamiento: hasta 1 día a 18 – 25 °C; hasta 3 días a 2 – 8 °C; almacenamiento durante un período más largo (hasta 6 meses) a -20 °C.

Se debe evitar la congelación y descongelación repetidas.

6. Procedimiento de prueba

Deje que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente y mezcle bien mediante inversión suave antes de su uso. Numere los tubos de reacción y las placas de micropocillos (las tiras de microtitulación que se retiran del marco para su uso deben marcarse en consecuencia para evitar cualquier confusión). Se recomiendan determinaciones duplicadas.

La unión de los antiseros y del conjugado enzimático y la actividad de la enzima dependen de la temperatura. Cuanto mayor sea la temperatura, mayores serán los valores de absorción. Los diferentes tiempos de incubación tendrán influencias similares en la absorbancia. La temperatura óptima durante el inmunoensayo enzimático es entre 20 y 25 °C.

⚠ *Es obligatorio el uso de un agitador de placas de microtitulación con las siguientes especificaciones: amplitud de agitación 3 mm; aprox. 600 rpm. Agitar con diferentes configuraciones puede influir en los resultados.*

⚠ *No exceda la temperatura durante el inmunoensayo enzimático de 20 – 25 °C y los tiempos de incubación prescritos. Una temperatura demasiado alta durante el inmunoensayo enzimático y tiempos de incubación demasiado prolongados pueden influir en los resultados.*

⚠ *¡Realice minuciosamente los pasos de lavado! Un mal lavado puede influir en los resultados.*

6.1 Preparación de reactivos y notas adicionales

Tampón de lavado

Diluir los 20 ml de tampón de lavado concentrado **WASH-CONC** **50x** con agua hasta un volumen final de 1000 ml. Almacenamiento: 2 meses a 2 – 8 °C.

Microplaca con tiras de Serotonina

En casos raros, se pueden ver residuos del reactivo de bloqueo y estabilización en los pocillos como pequeños puntos o líneas blancas. Estos residuos no influyen en la calidad del producto.

Reactivo de acilación

El reactivo de acilación (BA E-6612) tiene un punto de congelación de 18,5 °C. Para garantizar que el reactivo de acilación sea líquido cuando se use, se debe asegurar que el reactivo de acilación haya alcanzado la temperatura ambiente y forme una solución homogénea y libre de cristales antes de usarse. Si se necesitan más de 3 ml, combine el contenido de los viales individuales **ACYL-REAG** y mezclar bien.

6.2 Preparación de muestras – Acilación

- | | |
|----|---|
| 1. | Pipetee 20 µl de los estándares, controles y muestras en los respectivos tubos de reacción. |
| 2. | Agregar 500 µl ACYL-BUFF a todos los tubos. |
| 3. | Agregar 50 µl de ACYL-REAG a todos los tubos. |
| 4. | Mezcle bien los tubos de reacción (vortex) e incube durante 15 min a RT (20 – 25 °C). |

5. Agregar **500 µl de agua** a todos los tubos y mezclar bien (vortex).

⚠ Tomar **20 µl** de los estándares, controles y muestras acilados para el **Serotonin ELISA**.

6.3 Serotonin ELISA

1. Pipetar 20 µl de patrones, controles y muestras aciladas en los pocillos apropiados del SER 5-HIAA .
2. Pipetear 50 µl de SER-AS en todos los pocillos.
3. Incubar 60 min a RT (20 – 25 °C) en un agitador (aprox. 600 rpm).
4. Desechar o aspirar el contenido de los pocillos. Lavar la placa 4 veces agregando 300 µl de tampón de lavado, desechando el contenido y secando cada vez golpeando la placa invertida sobre material absorbente.
5. Pipetear 100 µl de CONJUGATE en cada pocillo.
6. Incubación de 30 min a RT (20°–25°C) en un agitador (aprox. 600 rpm).
7. Desechar o aspirar el contenido de los pocillos. lavar la placa 4 veces añadiendo 300 µl de Tampón de lavado, desechando el contenido y seque cada vez golpeando la placa invertida sobre un material absorbente.
8. Pipetear 100 µl de SUBSTRATE en cada pocillo.
9. Incubar por 25 ± 5 min a RT (20°–25°C) con un agitador (aprox. 600 rpm). ⚠ ¡Evite la exposición a la luz solar directa!
10. Agregar 100 µl del STOP-SOLN a todos los pocillos y agite brevemente la placa de microtitulación.
11. Leer la absorbancia de la solución en los pocillos en 10 minutos, utilizando un lector de placas de microtitulación configurado a 450 nm (si está disponible, se recomienda una longitud de onda de referencia entre 620 nm y 650 nm).

7. Cálculo de resultados

	Serotonina	
Rango de medición	Suero	8 – 2,170 ng/ml
	Orina	8 – 2,027 ng/ml

La curva estándar, que puede utilizarse para determinar la concentración de las muestras desconocidas, se obtiene trazando las lecturas de absorbancia (calcular la absorbancia media) de los estándares (lineal, eje y) frente a las concentraciones estándar correspondientes (logarítmica, eje x) utilizando una concentración de 0,001 ng/ml para el estándar A (esta alineación es obligatoria debido a la presentación logarítmica de los datos).

Utilice regresión no lineal para el ajuste de curvas (por ejemplo, 4 parámetros, Marquardt).

⚠ *Este ensayo es un ensayo competitivo. Esto significa que los valores de DO disminuyen al aumentar las concentraciones del analito. Los valores de DO encontrados por debajo de la curva estándar corresponden a concentraciones elevadas del analito en la muestra y deben notificarse como positivos.*

Las concentraciones de las muestras y los controles se pueden leer directamente en la curva estándar. Las muestras encontradas con concentraciones superiores al estándar más alto (Estándar F) deben diluirse en consecuencia con el Estándar A y deben volver a analizarse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta este factor de dilución.

La cantidad total de serotonina excretada en orina durante 24 horas se calcula de la siguiente manera:
 $\mu\text{g}/24\text{h} = \mu\text{g}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$

La cantidad de serotonina normalizada a creatinina se calcula de la siguiente manera:

$\mu\text{g}/\text{g de creatinina} = \text{ng/ml (serotonina)} / \text{creatinina (mg/dl)} \times 100$

Conversión

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

7.1 Valor de referencia esperado

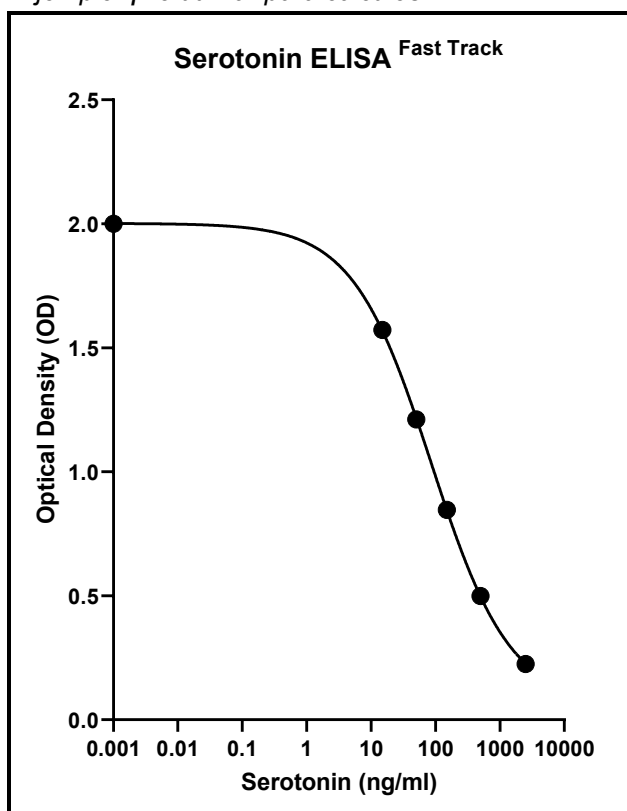
Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus propios valores de referencia. Como base para la determinación del rango de referencia interno se consideró el siguiente número de muestras para los parámetros respectivos: orina de 24 horas $n = 194$, orina espontánea (segunda orina de la mañana) $n = 81$, suero $n = 80$. Los rangos de referencia esperados fueron determinados en un estudio interno analizando muestras de una población europea aparentemente sana (intervalo de referencia del 95%).

	Serotonina
Rango de referencia orina de 24 horas	9 – 193 $\mu\text{g}/24\text{h}$ 24 – 124 $\mu\text{g}/\text{g}$ creatinina
Rango de referencia Orina espontánea (Segunda orina de la mañana)	30 – 129 $\mu\text{g}/\text{g}$ creatinina
Rango de referencia suero	20 – 206 ng/ml

Los valores significativamente fuera del rango de referencia deben ser evaluados por un médico.

7.2 Curva estándar típica

⚠ Ejemplo: ¡No utilizar para cálculos!



8. Muestras de control

Se recomienda utilizar muestras de control según la normativa nacional. Utilice controles tanto a nivel normal como patológico. Las muestras de control obtenidas comercialmente deben tratarse como muestras desconocidas. Las muestras de control deben estar dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza de los controles del kit se indican en el informe de control de calidad.

9. Características del ensayo

9.1 Datos de rendimiento

La sensibilidad analítica se determinó según la norma CLSI EP17-A2 vol. 32 núm. 8.

Para la determinación de la sensibilidad analítica se determinaron 5 muestras en blanco y 5 muestras de bajo nivel en 2 lotes de kit en 4 réplicas por muestra. Esto dio como resultado 60 resultados en blanco y 60 resultados de nivel bajo por lote.

Sensibilidad analítica	Serotonina
Límite de espacios en blanco (LOB)	2,9 ng/ml
Límite de detección (LOD)	5,9 ng/ml
Límite de Cuantificación (LOQ)	8,0 ng/ml

Especificidad analítica (reactividad cruzada)	
Sustancia	Reactividad cruzada (%)
Triptamina	0,171
Melatonina	< 0,1
Ácido 5-hidroxiindol acético	< 0,1
Fenilalanina	< 0,1
Histidina	< 0,1
Tiramina	< 0,1
5-hidroxitriptófano	< 0,1

La precisión de la variación intra e interensayo se investigó determinando la concentración de 6 muestras de suero y 6 muestras de orina en dos series por día en cada 2 réplicas durante 20 días (según el Estándar CLSI EP05-A3 Vol. 34 No. 13).

Precisión					
Intra-Ensayo			Inter-Ensayo		
Suero			Suero		
Muestra	Media ± SD [ng/ml]	CV [%]	Muestra	Media ± SD [ng/ml]	CV [%]
1	11,8 ± 2,1	17,6	1	11,8 ± 3,3	28,2
2	61,6 ± 5,2	8,4	2	61,6 ± 7,7	12,5
3	102 ± 8,6	8,5	3	102 ± 12,3	12,1
4	227 ± 15,5	6,8	4	227 ± 23,0	10,1
5	493 ± 25,2	5,1	5	493 ± 55,7	11,3
6	1.792 ± 109	6,1	6	1.792 ± 165	9,2
Orina			Orina		
Muestra	Media ± SD [ng/ml]	CV [%]	Muestra	Media ± SD [ng/ml]	CV [%]
1	18,1 ± 2,0	11,3	1	18,1 ± 4,0	22,2
2	55,2 ± 4,0	7,3	2	55,2 ± 6,4	11,7
3	153 ± 9,1	5,9	3	153 ± 14,6	9,5
4	240 ± 11,4	4,8	4	240 ± 21,9	9,1
5	498 ± 29,3	5,9	5	498 ± 44,5	8,9
6	1.798 ± 120	6,7	6	1.798 ± 221	12,3

Lote a lote			
	Muestra	Media ± SD [ng/ml]	CV [%]
Serotonina en orina (n = 6)	1	103 ± 6,5	6,4
	2	734 ± 63,3	8,6
Serotonina en suero (n = 6)	1	97,6 ± 7,9	8,1
	2	790 ± 62,3	7,9

La recuperación se determinó según la Norma CLSI EP 34 1ª ed.

Recuperación			
	Rango [ng/ml]	Media [%]	Rango [%]
Suero	49,4 – 1.046	98	84 – 112
Orina	10,0 – 1.023	91	82 – 98
Linealidad de la dilución de la muestra			
	Dilución en serie hasta	Media [%]	Rango [%]
Suero	1:64	103	93 – 113
Orina	1:64	98	88 – 111

La linealidad dentro del rango de medición se determinó según la norma CLSI EP06-Ed2. La linealidad se da si el valor determinado no se desvía más del 20% del valor previsto.

Rango lineal	
Suero	18 – 2.170 ng/ml
Orina	20 – 2.027 ng/ml

La comparación de métodos se realizó de acuerdo con la Norma CLSI EP09c 3ª ed.

Comparación de métodos ELISA vs. XLC-MS/MS	
Suero	$y = 0,99x - 9,2; r^2 = 0,996; n = 100$
Orina	$y = 0,9x - 20,7; r^2 = 0,988; n = 97$

9.2 Trazabilidad metrológica

Los valores asignados a los estándares y controles del ELISA Serotonina son trazables a Unidades SI mediante pesada con analito de calidad controlada..

Estándares y controles	Incertidumbre [%]
	2,5%

Serotonina ELISA		
Suero	Concentración [ng/ml]	Incertidumbre ampliada [%] k = 2*
	61,6	25,5
	227	20,8
Orina	Concentración [ng/ml]	Incertidumbre ampliada [%] k = 2*
	18,1	44,5
	55,2	23,9
	153	19,6
	240	18,9
	498	18,5
	1.798	25,1

* Esto define un intervalo sobre el resultado medido que incluirá el valor real con una probabilidad del 95%.

10. Referencias/Literatura

1. 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.
2. 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.
3. 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).
4. Bieger, W.P., *NeuroStress Guide*. 2011.
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/VEGFR4 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.

Para obtener literatura actualizada o cualquier otra información, comuníquese con su proveedor local.

11. Cambios

Versión	Fecha de lanzamiento	Capítulo	Cambios
17.1	2022-06-14	Todos	- Revisión del ensayo debido al reglamento IVDR (UE) 2017/746. Debido a esta revisión, todos los capítulos fueron revisados y modificados.
18.0	2023-03-20	7.1	- Frase: "Los valores significativamente fuera del rango de referencia deben ser evaluados por un médico". añadido
19.0	2023-09-07	4.1 9.1	- Etiquetado de riesgos actualizado según SDS - Lote a lote actualizado
20.0	2025-04-25	2.1 4.1 7 9.2	- Actualizado - Etiquetado de peligro actualizado según la ficha de datos de seguridad (FDS) - Nota añadida al factor de dilución en el cálculo - Trazabilidad metrológica actualizada

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Español	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
IVD	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
REF	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
LOT	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeits-datum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
V<x>	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta