

# IDK<sup>®</sup> Serotonin ELISA

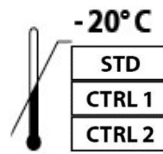
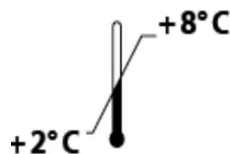
*Zur in-vitro-Bestimmung von Serotonin (5-HT) in Stuhl*

*For the in vitro determination of serotonin (5-HT) in stool*

Gültig ab / Valid from 2023-10-01

REF

K 6881



IVD



**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. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>3</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>5</b>
<i>Probenstabilität und -lagerung</i>	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema Derivatisierung</i>	7
<i>Pipettierschema Testdurchführung</i>	7
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>9</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>9</b>
<i>Biotininterferenz</i>	10
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>10</b>
<i>Referenzwerte</i>	10
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	10
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	11
<i>Linearität</i>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	12
<i>Analytische Spezifität</i>	12
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>13</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>13</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>14</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>14</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der Serotonin-Assay K 6881 ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) für professionelle Laboranwender zum quantitativen Nachweis der Konzentration von freiem Serotonin im Stuhl von Patienten jeden Alters und Geschlechts.

Der Assay ist ein medizinisches In-vitro-Diagnostikum, welches manuell oder mit einer automatisierten Plattform verwendet werden kann.

Der Nachweis einer verringerten oder erhöhten gastrointestinalen Serotonin-Konzentration im Stuhl von Patienten dient als diagnostisches Hilfsmittel, um einen behandelnden Therapeuten über die Notwendigkeit der Verschreibung angemessener diätetischer Maßnahmen wie der Einnahme von Probiotika oder der Empfehlung einer tryptophanreichen Diät zu informieren.

## 2. EINLEITUNG

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist ein wichtiger Neurotransmitter in der bidirektionalen Kommunikation der Darm-Hirn-Achse. Im menschlichen Körper wird Serotonin hauptsächlich (bis zu 95 %) von den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut produziert. In einer Vielzahl von Studien wurde nachgewiesen, dass 5-HT im engen Zusammenhang mit dem Reizdarmsyndrom steht, da es sich direkt auf die Darmmotilität auswirkt <sup>[1]</sup>. Das Reizdarmsyndrom ist durch eine gestörte Darmmotilität und eine viszerale Überempfindlichkeit gekennzeichnet. Daraus können Krampfanfälle und eine erhöhte Schmerzwahrnehmung während der Verdauung resultieren <sup>[2]</sup>. In diesem Zusammenhang scheint das enterische 5-HT eine Schlüsselrolle in der Pathologie des Reizdarmsyndroms zu spielen. Hier ist bekannt, dass bei Patienten mit geringer Motilität und chronischer funktioneller Verstopfung niedrigere 5-HT-Plasmaspiegel zu beobachten sind <sup>[3;4;5]</sup>. Umgekehrt werden bei Patienten mit hoher Darmmotilität oder Durchfall erhöhte 5-HT-Plasma- oder Serumspiegel und eine hohe spontane 5-HT-Freisetzung in der Schleimhaut beobachtet <sup>[6;7;8;9;10]</sup>. Zusammenfassend lassen sich zwei verschiedene Situationen unterscheiden. Verstopfungspatienten sind durch niedrige 5-HT-Spiegel gekennzeichnet, wohingegen Durchfallpatienten durch hohe 5-HT-Spiegel charakterisiert sind.

### 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6881	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0015	COPLATE	Kopplungsplatte	12 x 8 Vertiefungen
K 6881	STD	Standards, gebrauchsfertig (0, 10, 30, 100, 250, 750 ng/ml)	6 x 500 µl
K 6881	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 µl
K 6881	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 500 µl
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 7999.100	IDK® Amino Extract	Extraktionspuffer <i>IDK® Amino Extract</i> , gebrauchsfertig	1 x 100 ml
K 6881	AB	Serotonin-Antikörper, peroxidase- markiert, gebrauchsfertig	1 x 6 ml
K 6881	REABUF	Reaktionspuffer, gebrauchsfertig	1 x 70 ml
K 6881	DER	Derivatisierungsreagenz, lyophilisiert	1 x 100 mg
K 0008.07	DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 x 7 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), 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.

### 4. 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 7)

\* 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 (≥18,2 MΩ cm).

## 5. 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.

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### *Probenstabilität und -lagerung*

**Stuhlextrakt** ist 3 Tage bei Raumtemperatur oder 6 Tage bei 2-8°C haltbar. Zur längeren Lagerung bei -20 °C aufbewahren.

### *Stuhlprobenextraktion*

Wir empfehlen, das mit **IDK® Amino Extract** (Extraktionspuffer) **befüllte Stuhlprobenvorbereitungssystem (Artikel-Nr. K 7999)** zu verwenden.

Der Extraktionspuffer IDK® Amino Extract ist gebrauchsfertig. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

#### ***Stuhlprobenröhrchen - Anwendung***

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

#### ***Stuhlprobenröhrchen mit 0,75 ml Puffer:***

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen (IDK® Amino Extract):	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe der befüllten Stuhlprobenröhrchen wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o.Ä.
- b) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde). Der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.
- c) Das Röhrchen solange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls in Extraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.

- d) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u.Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- e) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Bei dem Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

**Verdünnung: 1:50**

Zur weiteren Probenvorbereitung werden **25 µl** der erhaltenen Suspension derivatisiert (siehe Pipettierschema Derivatisierung).

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von Serotonin aus Stuhl. Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zur Vorbereitung werden Standards, Kontrollen und extrahierte Proben mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen Serotonin versetzt. Anschließend werden in einer mit Serotonin-Derivat (Tracer) beschichteten ELISA-Platte die derivatisierten Proben zusammen mit einem peroxidasemarkierten polyklonalen Serotonin-Antikörper inkubiert. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem an die Platte gebundenen Tracer um die Bindung der polyklonalen Antikörper.

Nach einem Waschschrift 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 Standardkonzentration – 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 extrahierten Stuhlproben wird in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. 1,5-ml-Reaktionsgefäßen aus Polypropylen) durchgeführt. Alternativ dazu kann die Derivatisierung auch in den Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) durchgeführt werden.

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)/ extrahierte Stuhlprobe</b> in Mikroreaktionsgefäße bzw. in die Vertiefungen der Kopplungsplatte (COPLATE) pipettieren.
2.	<b>250 µl Reaktionspuffer (REABUF)</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) bzw. in jede Vertiefung der Kopplungsplatte pipettieren.
3.	<b>25 µl Derivatisierungsreagenz</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, Probe) pipettieren und <b>gründlich mischen</b> , z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen. Anschließend auf einem <b>Horizontalschüttler 30 min</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) inkubieren.  <i>Alternativ dazu:</i> <b>25 µl Derivatisierungsreagenz</b> in jede Vertiefung (STD, CTRL, Probe) der Kopplungsplatte pipettieren und sofort auf einem <b>Horizontalschüttler 30 min</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) 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.

4.	<b>2 x 50 µl der derivatisierten Standards/Kontrollen/Proben</b> aus den Mikroreaktionsgefäßen, oder der COPLATE, als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.
----	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

5.	<b>50 µl Serotonin-Antikörper</b> (AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Platte mit Folie dicht abkleben und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15-30°C) <b>unter Schütteln</b> inkubieren.
7.	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.
8.	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	<b>12-18 min*</b> bei Raumtemperatur (15-30 °C) im <b>Dunkeln</b> inkubieren.
10.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.
11.	<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 automaten-spezifische 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.

## 8. 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.

### Stuhlproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 50** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein anderer Verdünnungsfaktor verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs können mit Extraktionspuffer (IDK® Amino Extract) 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 x anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

$$LoB \times \text{anzuwendender Probenverdünnungsfaktor}$$

LoB siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

### *Biotininterferenz*

Proben, die Biotin in einer Konzentration von  $\leq 1200$  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.

## **10. 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*

#### **1 g Stuhl entspricht 1 ml.**

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich gesunden Personen ( $n = 40$ ) wurde ein Median von 1830 ng/g ermittelt. Die 10. Und die 90. Perzentile lagen bei 734 ng/g bzw. 2434 ng/g. Daraus ergibt sich folgender Normbereich:

Serotonin-Konzentration in Stuhl: 734 – 2434 ng/g

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## **11. TESTCHARAKTERISTIKA**

### *Genauigkeit – Präzision*

#### **Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 16**

Die Wiederholbarkeit wurde mit 4 Proben unter gleichbleibenden Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	4354	4,5
2	1229	6,1
3	1059	9,8
4	829	8,9

### Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 12

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

Probe	Mittelwert [ng/ml]	VK [%]
1	5180	8,3
2	1238	8,9
3	676	12,7

### Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Dafür wurden 3 niedrige Proben mit 3 hohen Proben versetzt (Spike) und gemessen. Die erwarteten Werte resultieren aus dem Mittel von Probe und Spike.

Probe [ng/ml]	Spike [ng/ml]	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
1273	5553	3413	3564	104,4
	3644	2459	2442	99,3
	2627	1950	1872	96,0
774	5553	3164	3313	104,7
	3644	2209	2348	106,3
	2627	1700	1634	96,1
807	5553	3180	3560	111,9
	3644	2226	2038	91,6
	2627	1717	1744	101,6

### 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 3 Stuhlproben nachgewiesen.

Für Serotonin in Stuhl wurde in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung der Probenverdünnung ein lineares Verhalten im Bereich von 7,0

bis 89,9 ng/ml nachgewiesen (352 bis 4495 ng/ml bei Einberechnen des Verdünnungsfaktors 50) mit einer Wiederfindung von 88,7 bis 114,8 % in diesem Bereich.

Probe [ng/ml]	Verdünnung	erwartet [ng/ml]	gemessen [ng/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:50		89,9	
	1:75	59,9	54,5	91,0
	1:100	44,9	44,6	99,1
	1:150	30,0	31,8	106,0
	1:200	22,5	19,9	88,7
	1:300	15,0	14,4	96,2
	1:400	11,2	12,5	111,6
B	1:50		42,2	
	1:75	28,1	29,5	105,0
	1:100	21,1	22,2	105,0
	1:150	14,1	14,3	102,0
	1:200	10,5	11,3	107,0
	1:300	7,0	8,1	114,8
C	1:50		30,1	
	1:75	20,1	20,1	99,9
	1:100	15,1	16,9	112,1
	1:150	10,0	11,2	111,8
	1:200	7,5	8,4	111,3

### Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert (*limit of blank, LoB*) 6,4 ng/ml

Nachweisgrenze (*limit of detection, LoD*) 8,1 ng/ml

Bestimmungsgrenze (*limit of quantitation, LoQ*) 9,0 ng/ml

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt. Das festgelegte Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze lag bei 20 % VK.

### Analytische Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter 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 %

## 12. 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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

## 13. 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.

## 14. 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 Immundiagnostik 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 Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

















## 15. LITERATUR

1. Gershon MD. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013 Feb; 20(1):14-21. doi: 10.1097/MED.0b013e32835bc703
2. Farzaei MH, Bahramsoltani R, Abdollahi M, Rahimi R. The Role of Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome: Pharmacological Targets and Novel Treatments. *J Neurogastroenterol Motil.* 2016, 22, 558–74. doi: 10.5056/jnm16001
3. Coates MD, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2004, 126, 1657–1664



4. Yazar A, Buyukafpar K, Polat G, et al. The urinary 5-hydroxyindole acetic acid and plasmanitric oxide levels in irritable bowel syndrome: a preliminary study. *Scott Med J*. 2005, 50, 27–29
5. Dunlop SP, Coleman NS, Blackshaw E, et al. Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005, 3(4), 349-357. doi: 10.1016/s1542-3565(04)00726-8
6. Jin DC, et al. Regulation of the serotonin transporter in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2016, 22, 8137–8148
7. Yu FY, Huang SG, Zhang HY, Ye H, Chi HG, Zou Y, et al. Comparison of 5-hydroxytryptophan signaling pathway characteristics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2016, 22, 3451–9
8. Fu R, Chen M, Chen Y, Mao G, Liu S. Expression and clinical significance of 5-HT and 5-HT3R in the intestinal mucosa of patient with diarrhea-type irritable bowel syndrome. *Exp Ther Med*. 2019, 13, 3077-3082. doi: 10.3892/etm.2019.7297
9. Cremon C, Carini G, Wang B, Vasina V, Cogliandro RF, De Giorgio R, Stanghellini V, Grundy D, Tonini M, De Ponti F, et al. Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol*. 2011, 106, 1290–1298.
10. Luo M, Zhuang X, Tian Z, Xiong L. Alterations in short-chain fatty acids and serotonin in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2021 Jan 6;21(1):14. doi: 10.1186/s12876-020-01577-5

**Verwendete Symbole:**

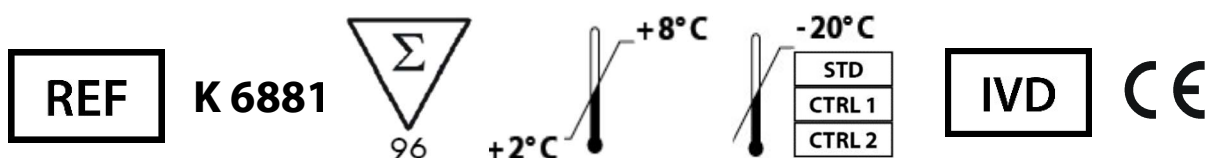
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	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 stool*

Valid from 2023-10-01



**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>19</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>20</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>21</b>
<i>Stability and storage of samples</i>	21
<i>Extraction of the stool samples</i>	21
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>22</b>
<i>Principle of the test</i>	22
<i>Derivatisation procedure</i>	23
<i>Test procedure</i>	24
<b>8. RESULTS</b>	<b>25</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>25</b>
<i>Biotin interference</i>	26
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>26</b>
<i>Reference Range</i>	26
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>26</b>
<i>Accuracy – Precision</i>	26
<i>Accuracy – Trueness</i>	27
<i>Linearity</i>	27
<i>Analytical sensitivity</i>	28
<i>Analytical specificity</i>	28
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>29</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>29</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>30</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>30</b>

## 1. INTENDED USE

The Serotonin assay K 6881 is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) intended for professional laboratory users for the quantitative detection of the free Serotonin concentration in stool from patients of any age and gender.

The assay is an *in vitro* diagnostic medical device, which can be used manually or by an automated platform.

The detection of a decreased or elevated gastrointestinal Serotonin concentration in the stool of a patient is used as a diagnostic aid to inform the treating therapist about the necessity to prescribe appropriate dietetic interventions such as the intake of probiotics or the recommendation of a tryptophan-rich diet.

## 2. INTRODUCTION

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is an important neurotransmitter in the two-way communication in the brain-gut axis. In the human body, this molecule is mainly produced (up to 95%) by the enterochromaffin cells of the intestinal mucosa. 5-HT is closely related to IBS, as it affects directly the gut motility, which has been found in numerous studies<sup>[1]</sup>. It is known, that IBS is characterised by aberrant gut motility and visceral hypersensitivity that collectively contribute to seizures and increased pain perception during digestion<sup>[2]</sup>. In this context, enteric 5-HT appears to be one of the key molecules in IBS pathology. It is known, that decreased plasma 5-HT levels are reported in patients with low motility and chronic functional constipation<sup>[3;4;5]</sup>. Vice-versa, elevated 5-HT plasma or serum levels and high spontaneous 5-HT release in mucosa are observed in patients with high gut motility or diarrhea<sup>[6;7;8;9;10]</sup>. In summary, two different kinds of situations can be identified. Constipation patients are characterized by low 5-HT levels. Diarrhea patients are characterized by high 5-HT levels.

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6881	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0015	COPLATE	Plate for derivatisation	12 x 8 wells
K 6881	STD	Standards, ready-to-use (0, 10, 30, 100, 250, 750 ng/ml)	6 x 500 µl
K 6881	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 500 µl

K 6881	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 500 µl
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 7999.100	IDK® Amino Extract	Extraction buffer <i>IDK® Amino Extract</i> , ready-to-use	1 x 100 ml
K 6881	AB	Serotonin antibody, peroxidase- labelled, ready-to-use	1 x 6 ml
K 6881	REABUF	Reaction buffer, ready-to-use	1 x 70 ml
K 6881	DER	Derivatisation reagent, lyophilised	1 x 100 mg
K 0008.07	DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO)	1 x 7 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), 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.

#### 4. 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 7)

\* 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).

#### 5. 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 can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2-8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Stability and storage of samples*

**Stool extract** is stable for 3 days at room temperature or for 6 days at 2-8 °C. For longer storage keep frozen at -20 °C.

### *Extraction of the stool samples*

We recommend using the **stool sample preparation system filled with IDK® Amino extract** (extraction buffer), **Cat No. K 7999**.

The extraction buffer IDK® Amino Extract is ready-to-use. We recommend the following sample preparation:

#### ***Stool sample tube – Instructions for use***

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer:

**Stool sample tube with 0.75 ml buffer:**

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer volume (IDK® Amino Extract):	0.75 ml
Dilution factor:	1:50

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the stool sample tubes as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenization using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place the dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- c) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for ~10 minutes improves the result.
- d) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- e) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

**Dilution: 1:50**

To **25 µl** of this suspension a derivatisation reagent is added (see derivatisation procedure).

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This ELISA is designed for the quantitative determination of serotonin in stool. 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 a peroxidase-



conjugated polyclonal serotonin antibody are incubated in 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.

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 extracted stool samples is carried out in reaction vials (e.g. 1.5 ml polypropylene vials). Alternatively, the derivatisation can be carried out in the wells of the COPLATE.

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>extracted sample</b> into the respective vials, or into the wells of the COPLATE.
2.	Add <b>250 µl reaction buffer</b> (REABUF) into each vial (STD, CTRL, sample), or into each well of the COPLATE.
3.	Add <b>25 µl derivatisation reagent</b> into each vial (STD, CTRL, sample) and <b>mix thoroughly</b> by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer. Incubate for <b>30 min</b> at room temperature (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .  <i>Alternatively:</i> Add <b>25 µl derivatisation reagent</b> into each well (STD, CTRL, sample) of the COPLATE and incubate immediately on a <b>horizontal shaker</b> for <b>30 min</b> at room temperature (15-30 °C).

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.

4.	For the analysis in duplicate take <b>2 x 50 µl</b> of the <b>derivatised standards/controls/samples</b> out of the vials, or the COPLATE, and add into the respective wells of the microtiter plate.
5.	Add <b>50 µl serotonin antibody</b> (AB) into each well of the microtiter plate.
6.	Cover the plate tightly with foil and incubate for <b>1 hour at room temperature</b> (15-30 °C) on a <b>horizontal shaker</b> .
7.	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.
8.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.
9.	Incubate for <b>12-18 min*</b> at room temperature (15-30 °C) in the <b>dark</b> .
10.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.
11.	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.

## 8. 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.

### Stool samples

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor of 50** to get the actual concentrations.

In case another dilution factor has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range can be diluted with extraction buffer (IDK® Amino Extract) and re-assayed. Please consider this higher dilution 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:

$$LoB \times \text{sample dilution factor to be used}$$

LoB see chapter "Performance Characteristics".

### *Biotin interference*

Samples containing a biotin concentration of  $\leq 1200$  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.

## 10. 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*

#### **1 g stool is equivalent to 1 ml.**

Based on in-house studies with samples of apparently healthy persons, a median of 1830 ng/g was determined ( $n = 40$ ). The 10<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentile were 734 ng/g and 2434 ng/g, respectively, resulting in the following normal range:

Serotonin concentration in stool: 734 - 2434ng/g

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 16**

The repeatability was assessed with 4 samples under constant parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

sample	mean value [ng/ml]	CV [%]
1	4354	4,5
2	1229	6,1
3	1059	9,8
4	829	8,9

### Reproducibility (Inter-Assay); n = 12

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

sample	mean value [ng/ml]	CV [%]
1	5180	8.3
2	1238	8.9
3	676	12.7

### Accuracy – Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, three high level samples (spikes) were added to 3 low level samples. The expected values result from the mean of sample and spike.

sample [ng/ml]	spike [ng/ml]	expected [ng/ml]	obtained [ng/ml]	recovery [%]
1273	5553	3413	3564	104.4
	3644	2459	2442	99.3
	2627	1950	1872	96.0
774	5553	3164	3313	104.7
	3644	2209	2348	106.3
	2627	1700	1634	96.1
807	5553	3180	3560	111.9
	3644	2226	2038	91.6
	2627	1717	1744	101.6

### 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 3 extracted stool samples.

For Serotonin in stool, the method has been demonstrated to be linear from 7.0 to 89.9 ng/ml based on the standard curve without considering possibly used sample

dilution factors (352 to 4495 ng/ml when considering the dilution factor of 50), showing a recovery rate of 88.7 – 114.8 % in this interval.

sample [ng/ml]	dilution	expected [ng/ml]	obtained [ng/ml]	recovery [%]
A	1:50		89.9	
	1:75	59.9	54.5	91.0
	1:100	44.9	44.6	99.1
	1:150	30.0	31.8	106.0
	1:200	22.5	19.9	88.7
	1:300	15.0	14.4	96.2
	1:400	11.2	12.5	111.6
B	1:50		42.2	
	1:75	28.1	29.5	105.0
	1:100	21.1	22.2	105.0
	1:150	14.1	14.3	102.0
	1:200	10.5	11.3	107.0
	1:300	7.0	8.1	114.8
C	1:50		30.1	
	1:75	20.1	20.1	99.9
	1:100	15.1	16.9	112.1
	1:150	10.0	11.2	111.8
	1:200	7.5	8.4	111.3

### *Analytical sensitivity*

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard curve without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB 6.4 ng/ml

Limit of detection, LoD 8.1 ng/ml

Limit of quantitation, LoQ 9.0 ng/ml

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2. The specified accuracy goal for the LoQ was 20 % CV.

### *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 %

## 12. 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 harmful to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions can also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances should be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- 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.

## 13. 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.

## 14. 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.

















## 15. REFERENCES

1. Gershon MD. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013 Feb; 20(1):14-21. doi: 10.1097/MED.0b013e32835bc703
2. Farzaei MH, Bahramsoltani R, Abdollahi M, Rahimi R. The Role of Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome: Pharmacological Targets and Novel Treatments. *J Neurogastroenterol Motil.* 2016, 22, 558–74. doi: 10.5056/jnm16001
3. Coates MD, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2004, 126, 1657–1664
4. Yazar A, Buyukafpar K, Polat G, et al. The urinary 5-hydroxyindole acetic acid and plasmanitric oxide levels in irritable bowel syndrome: a preliminary study. *Scott Med J.* 2005, 50, 27–29
5. Dunlop SP, Coleman NS, Blackshaw E, et al. Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005, 3(4), 349-357. doi: 10.1016/s1542-3565(04)00726-8
6. Jin DC, et al. Regulation of the serotonin transporter in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 2016, 22, 8137–8148



7. Yu FY, Huang SG, Zhang HY, Ye H, Chi HG, Zou Y, et al. Comparison of 5-hydroxytryptophan signaling pathway characteristics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2016, 22, 3451–9
8. Fu R, Chen M, Chen Y, Mao G, Liu S. Expression and clinical significance of 5-HT and 5-HT3R in the intestinal mucosa of patient with diarrhea-type irritable bowel syndrome. *Exp Ther Med.* 2019, 13, 3077-3082. doi: 10.3892/etm.2019.7297
9. Cremon C, Carini G, Wang B, Vasina V, Cogliandro RF, De Giorgio R, Stanghellini V, Grundy D, Tonini M, De Ponti F, et al. Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 2011, 106, 1290–1298.
10. Luo M, Zhuang X, Tian Z, Xiong L. Alterations in short-chain fatty acids and serotonin in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2021 Jan 6;21(1):14. doi: 10.1186/s12876-020-01577-5

#### Used 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