

# **IDK<sup>®</sup> Serotonin ELISA**

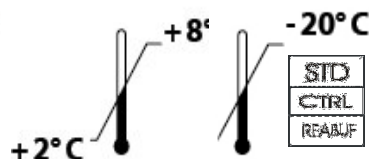
***Zur in-vitro-Bestimmung von Serotonin (5-HT) in humanem Serum***

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

Gültig ab / Valid from 2016-01-04



**K 6880**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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

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

# Inhalt

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>                          | <b>2</b>  |
| <b>2. INHALT DER TESTPACKUNG</b>                    | <b>2</b>  |
| <b>3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b> | <b>2</b>  |
| <b>4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>  | <b>3</b>  |
| <b>5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG</b>          | <b>4</b>  |
| <b>6. TESTDURCHFÜHRUNG</b>                          | <b>5</b>  |
| <i>Testprinzip</i>                                  | 5         |
| <i>Pipettierschema Probenvorbereitung</i>           | 5         |
| <i>Pipettierschema Testdurchführung</i>             | 6         |
| <b>7. ERGEBNISSE</b>                                | <b>8</b>  |
| <b>8. EINSCHRÄNKUNGEN</b>                           | <b>9</b>  |
| <b>9. QUALITÄTSKONTROLLE</b>                        | <b>9</b>  |
| <i>Referenzwerte</i>                                | 9         |
| <b>10. TESTCHARAKTERISTIKA</b>                      | <b>10</b> |
| <i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>             | 10        |
| <i>Spike-Wiederfindung</i>                          | 10        |
| <i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>              | 10        |
| <i>Analytische Sensitivität</i>                     | 11        |
| <b>11. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>                      | <b>11</b> |
| <b>12. TECHNISCHE MERKMALE</b>                      | <b>12</b> |
| <b>13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>             | <b>13</b> |
| <b>14. LITERATUR</b>                                | <b>13</b> |

## 1. VERWENDUNGSZWECK

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

## 2. INHALT DER TESTPACKUNG

| Artikel Nr.      | Bezeichnung      | Kit Komponenten  | Menge               |
|------------------|------------------|--|---------------------|
| K 6880           | PLATE            | Mikrotiterplatte, vorbeschichtet                                     | 12 x 8 Vertiefungen |
| K 6880           | STD              | Standards, gebrauchsfertig<br>(0, 15, 50, 100, 250, 750 ng/ml)       | 6 x 200 µl          |
| K 6880<br>K 6880 | CTRL 1<br>CTRL 2 | Kontrollen, gebrauchsfertig<br>(Bereich der Spezifikation entnehmen) | 2 x 200 µl          |
| K 6880           | WASHBUF          | ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x                                     | 2 x 100 ml          |
| K 6880           | CONJ             | Konjugat, Peroxidase-markiert,<br>Konzentrat                         | 1 x 50 µl           |
| K 6880           | CONJBUF          | Konjugatstabilisierungspuffer,<br>gebrauchsfertig                    | 1 x 13 ml           |
| K 6880           | REABUF           | Reaktionspuffer, gebrauchsfertig                                     | 2 x 30 ml           |
| K 6880           | DER              | Derivatisierungsreagenz  | 2 x 50 mg           |
| K 6880           | DMF              | Dimethylformamid (DMF)   | 1 x 7 ml            |
| K 6880           | ASYREAG          | Assayreagenz, lyophilisiert  | 2 x 30 ml lyo.      |
| K 6880           | SUB              | TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin),<br>gebrauchsfertig               | 1 x 15 ml           |
| K 6880           | STOP             | ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig                                   | 1 x 15 ml           |

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

## 3. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*

- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 6)

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

#### 4. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so je nach Probenaufkommen bis zu 2 x bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (**100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser**), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das Pufferkonzentrat kann bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die verdünnte Pufferlösung ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **Standards (STD)** und die **Kontrollen (CTRL1, CTRL2)** werden eingefroren bei **-20 °C** gelagert. Für den Test die Standards und Kontrollen auftauen und für mehrere Sekunden gründlich vortexen. Eventuell auftretende Flocken können durch leichtes Erwärmen gelöst werden. Nach Gebrauch wieder einfrieren. Standards und Kontrollen können mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren werden.

- Der **Reaktionspuffer (REABUF)** wird eingefroren bei **-20 °C** gelagert. Für den Test den Reaktionspuffer auf Raumtemperatur bringen und kurz vortexen. Nach Gebrauch den Reaktionspuffer wieder einfrieren.
  - Der Inhalt eines Fläschchens **Derivatisierungsreagenz (DER) (50 mg) wird in 3 ml DMF** gelöst und das Fläschchen für 5 min auf einen Horizontal-schüttler gelegt. ACHTUNG: DMF ist giftig, bitte Vorsichtsmaßnahmen beachten (siehe Kapitel 11). Das DER sollte **unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt** werden. Falls mehrere Fläschchen benötigt werden, deren Inhalt vereinen und vor Gebrauch mischen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu entsorgen. Durch die Aufteilung des DER in zwei Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar. Bitte beachten: DMF greift Plastik an, DMF reagiert nicht mit Polypropylen-Produkten und Glasgefäßen.
  - Der Inhalt einer Flasche **Assayreagenz (ASYREAG)** wird in **30 ml verdünntem Waschpuffer** gelöst. Gründlich vortexen und die Flasche für 10 min auf einen Schüttler legen, noch einmal gründlich mischen und sicherstellen, dass alles gelöst ist. Falls mehrere Flaschen benötigt werden, deren Inhalt in einem separaten Gefäß vereinen und vor Gebrauch mischen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen. Durch die Aufteilung des ASYREAG in zwei Gefäße ist der ELISA in zwei Ansätze teilbar.
  - Das **Peroxidase-Konjugat (CONJ)** wird **1:501** in Konjugatstabilisierungspuffer (CONJBUF) verdünnt (z.B. **24 µl CONJ + 12 ml CONJBUF**; nur die benötigte Menge ansetzen). Unverdünntes Konjugat ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünntes Konjugat kann **1 Woche bei 2-8 °C** aufbewahrt werden.
1. Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 5. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

- Die Haltbarkeit der Serumproben beträgt bei 2-8 °C bis zu 48 Stunden. Zur längeren Lagerung müssen die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden. Serotonin ist lichtempfindlich, daher müssen die Proben nach der Abnahme kühl und dunkel gelagert werden.
- Lipämische und hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden.
- Proben mit sichtbaren Mengen an Feststoff sollten zentrifugiert werden.

- Die Serumproben werden **unverdünnt** verwendet.
- Zur weiteren Vorbereitung muss die Probe mit einem Derivatisierungsreagenz (DER) zur Derivatisierung des enthaltenen Serotonin versetzt werden (Details siehe Pipettierschema Probenvorbereitung).

## 6. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Der Test basiert auf der Methode des kompetitiven Enzymimmunoassays. Zur Vorbereitung wird die zu untersuchende Probe mit einem Derivatisierungsreagenz zur Derivatisierung des enthaltenen Serotonin versetzt. Außerdem wird ein Assayreagenz zugegeben, welches Serotonin-Derivat (Tracer) enthält.

Anschließend wird die so vorbereitete Probe in einer ELISA-Platte inkubiert, welche mit einem polyklonalen Antikörper gegen Serotonin-Derivat beschichtet ist. Während der Inkubation kompetitiert das Zielantigen in der Probe mit dem Tracer um die Bindung an die polyklonalen Antikörper. Hierbei verdrängt das Zielantigen in der Probe den Tracer aus der Bindung an den Antikörper. Daher ist die Konzentration des an den Antikörper gebundenen Tracers umgekehrt proportional zu der Konzentration des Zielantigens in der Probe.

Beim zweiten Inkubationsschritt wird ein Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an den Tracer bindet. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Komponenten wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. 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 Konzentration von Serotonin in der Probe reduziert sich die Konzentration des an den Antikörper gebundenen Tracers 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 Probenvorbereitung*

Die Derivatisierung der Standards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der Proben (SAMPLE) wird als Einzelbestimmung in Mikroreaktionsgefäßen (z.B. **2 ml**-Reaktionsgefäßen) durchgeführt.

Die Reagenzien dieses Kits reichen aus für 48 Derivatisierungen, welche jeweils als Doppelbestimmung in die Wells der Mikrotiterplatte aufgetragen werden.

|   |
|---|
| 1. Vor Gebrauch alle <b>Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur</b> (15-30 °C) bringen, gut mischen.   |
| 2. Jeweils <b>25 µl Standard (STD)</b> , <b>25 µl Kontrolle (CTRL)</b> bzw. <b>25 µl Probe (SAMPLE)</b> in Mikroreaktionsgefäße pipettieren.  |
| 3. <b>500 µl Reaktionspuffer (REABUF)</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren.  |
| 4. <b>50 µl</b> frisch angesetztes <b>Derivatisierungsreagenz (DER)</b> in alle Reaktionsgefäße (STD, CTRL, SAMPLE) pipettieren, <b>gründlich mischen</b> (z.B. durch mehrmaliges Umdrehen, oder mehrere Sekunden vortexen) und auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) <b>30 min bei Raumtemperatur</b> (15-30 °C) inkubieren. |
| 5. Anschließend in alle verwendeten Mikroreaktionsgefäße <b>1 ml Assayreagenz (ASYREAG)</b> zugeben und gut mischen.  |

**2 x 100 µl der so vorbereiteten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)** werden im ELISA als Doppelbestimmung eingesetzt.

### *Pipettierschema Testdurchführung*

|  |
|--|
| 6. Positionen für Standards/ Kontrollen/ Proben (STD/ CTRL/ SAMPLE) in Doppelbestimmungen in einem <b>Protokollblatt</b> markieren.  |
| 7. Benötigte <b>Mikrotiterstreifen (PLATE)</b> aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterplattenstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden. |
| 8. Mikrotiterstreifen <b>5 x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen und nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen   |
| 9. <b>2 x 100 µl</b> der vorbereiteten, <b>derivatisierten Proben (STD, CTRL, SAMPLE)</b> aus den Mikroreaktionsgefäßen als Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.         |
| 10. Platte abdecken und <b>1 Stunde bei Raumtemperatur</b> (15-30 °C) auf einem Horizontalschüttler (180-240 rpm) inkubieren.  |

|  |
|--|
| 11. Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.  |
| 12. <b>100 µl</b> verdünntes <b>Peroxidase-Konjugat (CONJ)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.   |
| 13. Platte abdecken und <b>30 min bei Raumtemperatur</b> (15-30 °C) unter <b>Schütteln</b> (180-240 rpm) inkubieren.   |
| 14. Inhalt der Platte verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl</b> verdünntem <b>Waschpuffer</b> waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.  |
| 15. <b>100 µl TMB-Substrat (SUB)</b> in alle Vertiefungen pipettieren.   |
| 16. <b>7-12 min bei Raumtemperatur</b> (15-30 °C) im Dunkeln inkubieren.*  |
| 17. <b>100 µl Stopplösung (STOP)</b> in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.  |
| 18. <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. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.



## 7. ERGEBNISSE

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

### 1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden, z.B. 0,001).

### 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

### 3. Gewichtete Spline-Funktion

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

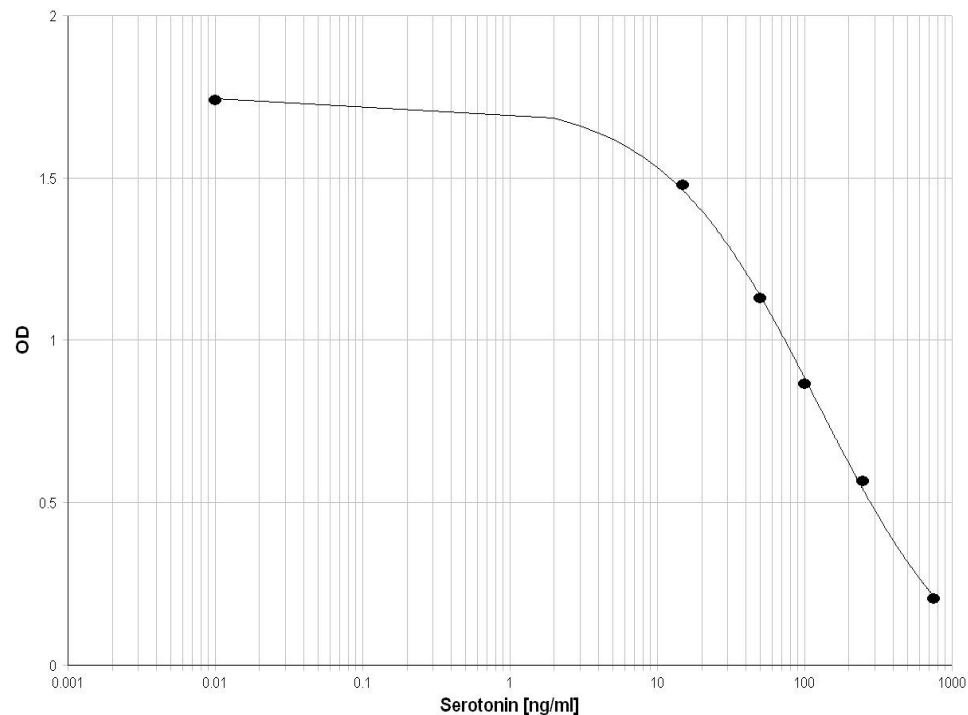
Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

### Serum

Die Konzentrationen der Proben können direkt aus der Standardkurve in ng/ml abgelesen werden. Es wird **kein Faktor** benötigt.

Falls eine Probe verdünnt worden ist, so ist die ermittelte Konzentration mit diesem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Beispiel einer Standardkurve. Sie darf nicht zur Auswertung der Messwerte benutzt werden.



## 8. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD niedriger ist als die des höchsten Standards, sollten mit Reaktionspuffer (REABUF) verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diesen Verdünnungsfaktor bei der Ergebnisberechnung.

## 9. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik 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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich gesunden Personen (n = 36) wurde ein Mittelwert von 225 ng/ml ermittelt, bei einer Standardabweichung von 86 ng/ml.

**Serum-Mittelwert  $\pm$  2 Standardabweichungen** **225  $\pm$  172 ng/ml**

**Normalbereich Serum:** **53 – 397 ng/ml**

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### **Intra-Assay (n = 8)**

| Probe | Serotonin [ng/ml] | VK [%] |
|-------|-------------------|--------|
| 1     | 171,5             | 8,4    |
| 2     | 80,3              | 12,1   |

#### **Inter-Assay (n = 6)**

| Probe | Serotonin [ng/ml] | VK [%] |
|-------|-------------------|--------|
| 1     | 293,1             | 9,0    |
| 2     | 400,9             | 18,9   |

### *Spike-Wiederfindung*

Zwei Serumproben wurden mit unterschiedlichen Serotonin-Mengen versetzt (Spike) und im ELISA gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 102,5 % (n = 2).

| Probe [ng/ml] | Spike [ng/ml] | Serotonin erwartet [ng/ml] | Serotonin gemessen [ng/ml] | Wiederfindung [%] |
|---------------|---------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|
| 180,6         | 100           | 280,6                      | 298,4                      | 106,3             |
| 180,6         | 200           | 380,6                      | 402,3                      | 105,7             |
| 100,3         | 100           | 200,3                      | 186,3                      | 93,0              |
| 100,3         | 200           | 300,3                      | 315,6                      | 105,1             |

### *Wiederfindung in der Verdünnung*

Zwei gespikete Serumproben wurden mit Reaktionspuffer verdünnt und im Test gemessen. Die mittlere Wiederfindung betrug 99,4 % (n = 2).

| Probe [ng/ml] | Verdünnung | Serotonin erwartet [ng/ml] | Serotonin gemessen [ng/ml] | Wiederfindung [%] |
|---------------|------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|
| 175,1         | 1:2        | 87,6                       | 92,5                       | 105,6             |
| 175,1         | 1:4        | 43,8                       | 48,0                       | 109,5             |
| 246,8         | 1:2        | 123,4                      | 114,0                      | 92,3              |
| 246,8         | 1:4        | 61,7                       | 55,7                       | 90,2              |

### Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 - 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 36 x der Standard Null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 2,3 ng/ml.

| Probe         | Mittelwert [OD] | 2 Standardabweichungen (2 x SD) | Nachweisgrenze [ng/ml] |
|---------------|-----------------|---------------------------------|------------------------|
| Standard Null | 2,186           | 0,13                            | 2,3                    |

### Spezifität

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

|                     |          |
|---------------------|----------|
| 3-Indolacrylsäure   | < 0,01%  |
| Indol-3-Pyruvat     | < 0,04%  |
| 3-Indolacetat       | < 0,05 % |
| 5-Methoxytryptophol | < 0,08 % |
| L-5-OH-Tryptophan   | < 0,01 % |

## 11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.

- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- DMF ist giftig. DMF kann das Kind im Mutterleib schädigen und ist gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Hautkontakt. Arbeiten mit DMF sollten daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille unter dem Abzug vorgenommen werden. Bei Haut- oder Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt konsultieren.

## 12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums 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 im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

### 13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

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

### 14. LITERATUR

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

**Verwendete Symbole:**

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer

*In-Vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

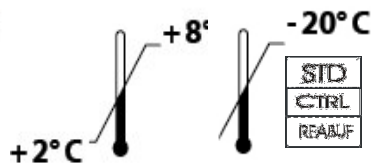
# IDK<sup>®</sup> Serotonin ELISA

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

Valid from 2016-01-04



**K 6880**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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>18</b> |
| <b>2. MATERIAL SUPPLIED</b>                             | <b>18</b> |
| <b>3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>            | <b>18</b> |
| <b>4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>           | <b>19</b> |
| <b>5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES</b>            | <b>20</b> |
| <b>6. ASSAY PROCEDURE</b>                               | <b>20</b> |
| <i>Principle of the test</i>                            | 20        |
| <i>Sample preparation procedure</i>                     | 21        |
| <i>Test procedure</i>                                   | 22        |
| <b>7. RESULTS</b>                                       | <b>23</b> |
| <b>8. LIMITATIONS</b>                                   | <b>24</b> |
| <b>9. QUALITY CONTROL</b>                               | <b>25</b> |
| <i>Reference range</i>                                  | 25        |
| <b>10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>                  | <b>25</b> |
| <i>Precision and reproducibility</i>                    | 25        |
| <i>Spiking recovery</i>                                 | 26        |
| <i>Dilution recovery</i>                                | 26        |
| <i>Analytical sensitivity</i>                           | 26        |
| <i>Specificity</i>                                      | 27        |
| <b>11. PRECAUTIONS</b>                                  | <b>27</b> |
| <b>12. TECHNICAL HINTS</b>                              | <b>27</b> |
| <b>13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b> | <b>28</b> |
| <b>14. REFERENCES</b>                                   | <b>28</b> |

## 1. INTENDED USE

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

## 2. MATERIAL SUPPLIED

| Catalog No.      | Label            | Kit Components  | Quantity       |
|------------------|------------------|---|----------------|
| K 6880           | PLATE            | Holder with precoated strips                                | 12 x 8 wells   |
| K 6880           | STD              | Standards, ready to use<br>(0, 15, 50, 100, 250, 750 ng/ml) | 6 x 200 µl     |
| K 6880<br>K 6880 | CTRL 1<br>CTRL 2 | Controls, ready to use<br>(see specification for range)     | 2 x 200 µl     |
| K 6880           | WASHBUF          | ELISA wash buffer concentrate, 10x                          | 2 x 100 ml     |
| K 6880           | CONJ             | Conjugate (peroxidase-labeled),<br>concentrate              | 1 x 50 µl      |
| K 6880           | CONJBUF          | Conjugate stabilizing buffer, ready to use                  | 1 x 13 ml      |
| K 6880           | REABUF           | Reaction buffer, ready to use                               | 2 x 30 ml      |
| K 6880           | DER              | Derivatization reagent                                      | 2 x 50 mg      |
| K 6880           | DMF              | Dimethylformamide (DMF)                                     | 1 x 7 ml       |
| K 6880           | ASYREAG          | Assay reagent, lyophilized                                  | 2 x 30 ml lyo. |
| K 6880           | SUB              | TMB substrate (tetramethylbenzidine),<br>ready to use       | 1 x 15 ml      |
| K 6880           | STOP             | ELISA stop solution, ready to use                           | 1 x 15 ml      |

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

## 3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water\*
- Calibrated precision pipets and 10-1000 µl tips

- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Centrifuge, 3000 x *g*
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 6)

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

#### 4. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 2 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- Dilute the **wash buffer concentrate (WASHBUF)** with ultra pure water **1:10** before use (**100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water**), mix well. Crystals may occur due to high salt concentration in the stock solution. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37 °C using a water bath before dilution. The buffer concentrate is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Diluted buffer solution can be stored in a closed flask at **2-8 °C for one month.**
- Store **Standards (STD)** and **controls (CTRL1, CTRL2)** frozen at **-20 °C**, thaw before use in the test and mix thoroughly for several seconds on a vortex mixer. Any occurring solid matter can be dissolved by gentle warming. Re-freeze after use. Standards and controls can be thawed and refrozen for several times.
- Store **reaction buffer (REABUF)** frozen at **-20 °C**. Bring to room temperature and mix before use in the test. Re-freeze after use.
- Dissolve the content of one vial of **derivatization reagent (DER) (50 mg) in 3 ml DMF**. CAUTION! DMF is toxic (see chapter 11 - precautions). Put the vial on a horizontal shaker for 5 min. DER must be **prepared immediately**

**before use.** When more than one vial is to be used, combine the contents and mix prior to use. Dispose of any rest of the reagent after use. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two DER vials. Please note: DMF attacks all plastics but not polypropylene products and laboratory glass.

- Dissolve the **assay reagent (ASYREAG)** in **30 ml of diluted wash buffer (WASHBUF)**, mix thoroughly. Put the vial on a horizontal shaker for 10 min and ensure complete dissolving of any solid matter. When more than one vial is to be used, combine the contents in a separate container and mix prior to use. Discard any rest after use. The ELISA kit can be separated into two performances by providing two vials of assay buffer
- Dilute the **peroxidase conjugate (CONJ) 1:501** with conjugate stabilizing buffer (CONJBUF) (e.g. **25 µl CONJ + 12 ml CONJBUF**, prepare only the required amount). The undiluted POD conjugate is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Diluted POD conjugate can be stored at **2-8 °C for 1 week.**
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8 °C.**

## 5. PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES

- The serum samples are stable for up to 48 hours at 2-8 °C. For longer storage keep samples frozen at -20 °C. As serotonin is sensitive to light, store samples in a cool and dark place after collection.
- Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis.
- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged.
- The serum samples are analyzed **undiluted.**
- For sample preparation a derivatization reagent (DER) for derivatization of serotonin is added (details are given in the sample preparation procedure).

## 6. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This assay is based on the method of competitive enzyme linked immunoassays. The sample preparation includes the addition of a

derivatization reagent for serotonin derivatization. Assay reagent is also added containing serotonin-derivative (tracer). Afterwards, the treated samples are incubated in wells of a microtiter plate coated with a polyclonal antibody against serotonin-derivative. During the incubation period, the target serotonin in the sample competes with the tracer for the binding of the polyclonal antibodies immobilized on the wall of the microtiter wells. The serotonin in the sample displaces the tracer out of the binding to the antibodies. Therefore, the concentration of the antibody-bound tracer is inverse proportional to the serotonin concentration in the sample.

During the second incubation step, a peroxidase conjugate is added to each microtiter well to detect the tracer. 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 color changes from blue to yellow, and the absorbance is measured in a photometer at 450 nm. The intensity of the yellow color is inverse proportional to the serotonin concentration in the sample; this means, high serotonin concentration in the sample reduces the concentration of antibody-bound tracer and lowers the photometric signal.

A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. serotonin present in the patient samples is determined directly from this curve.

### *Sample preparation procedure*

Derivatization of standards (STD), controls (CTRL) and samples (SAMPLE) is carried out in single analysis in vials (e.g. **2 ml** vials).

The reagents provided with this kit are sufficient for up to 48 derivatizations, which are transferred in duplicate determinations to the wells of the microtiter plate.

1. Bring all reagents and samples to **room temperature** (15-30 °C) and mix well.
2. Add **25 µl of standards (STD)**, **25 µl of controls (CTRL)**, and **25 µl of samples (SAMPLE)** in the corresponding vials.
3. Add **500 µl of reaction buffer (REABUF)** into each vial (STD, CTRL, SAMPLE).

4. Add **50 µl** of freshly prepared **derivatization reagent (DER)** into each vial (STD, CTRL, SAMPLE), **mix thoroughly** by repeated inversion or several seconds on a vortex mixer and incubate for **30 min at room temperature** (15-30°C) on a horizontal **shaker** (180-240 rpm).
5. Afterwards add **1 ml of assay reagent (ASYREAG)** into each vial and mix well.

**2 x 100 µl of each treated sample (STD, CTRL, SAMPLE)** are used in the ELISA as duplicates.

### *Test procedure*

6. Mark the positions of standards (STD)/ controls (CTRL)/samples (SAMPLE) in duplicate on a **protocol sheet**.
7. Take as many **microtiter plate strips (PLATE)** as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.
8. Wash each well **5 x** with **250 µl of diluted wash buffer**. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
9. For the analysis in duplicate take **2 x 100 µl** of the **derivatized standards/ controls/ samples (STD/ CTRL/ SAMPLE)** out of the vials and add into the respective wells.
10. Cover the plate and incubate for **1 hour at room temperature** (15-30 °C) on a horizontal shaker (180-240 rpm).
11. Discard the contents of each well. Wash each well **5 x** with **250 µl of diluted wash buffer**. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
12. Add **100 µl** of diluted **peroxidase conjugate (CONJ)** into each well.
13. Cover the plate and incubate for **30 min at room temperature** (15-30 °C) on a horizontal **shaker** (180-240 rpm).

14. Discard the contents of each well. Wash each well **5 x** with **250 µl** of **diluted wash buffer**. After the final washing step the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
15. Add **100 µl of TMB substrate (SUB)** into each well.
16. Incubate for **7-12 min** at **room temperature** (15-30 °C) in the dark\*.
17. Add **100 µl of stop solution (STOP)** into each well, mix thoroughly.
18. Determine **absorption immediately** with an ELISA reader at **450 nm** 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 **405 nm** against 620 nm (690 nm) as a reference.

\* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop 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. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

## 7. RESULTS

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

### 1. 4 parameter algorithm

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

### 2. Point-to-point calculation

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



### 3. Spline algorithm

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

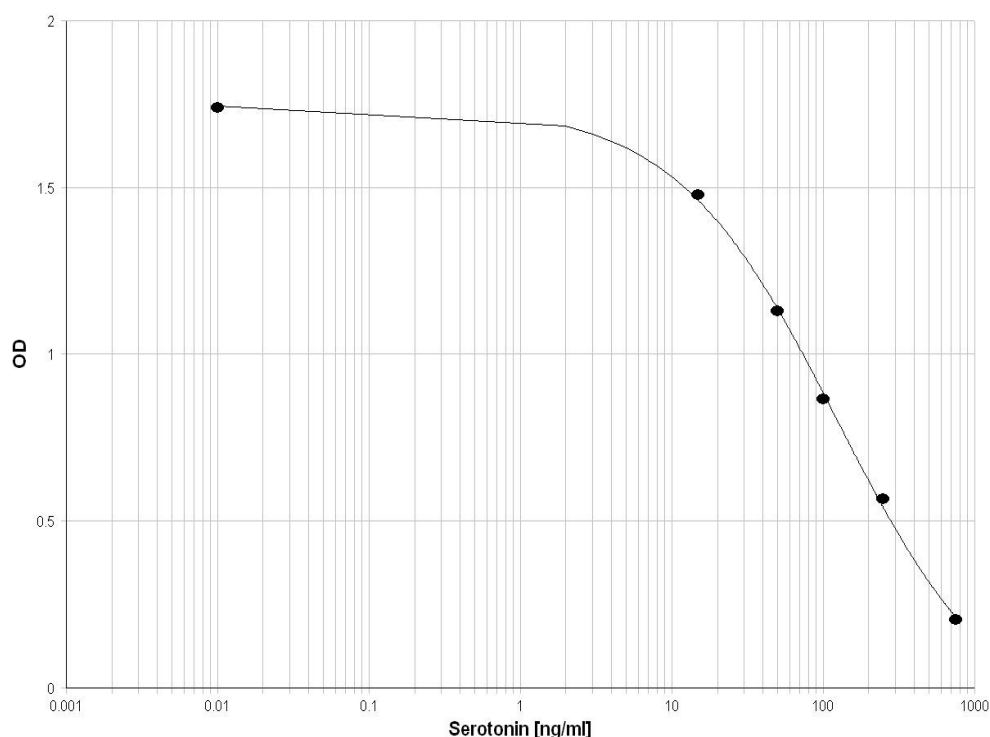
The plausibility of the duplicate values should be examined before automatically evaluating the results. If this option is not available within the used program, the duplicate values should be evaluated manually.

#### Serum

The concentrations can be determined directly from the standard curve in ng/ml. **No factor** is needed.

If a sample has been diluted, multiply the obtained result by the dilution factor used.

In the following, an example of a standard curve is given; do not use it for the calculation of your results.



## 8. LIMITATIONS

Samples with an OD lower than the OD of the highest standard should be diluted with reaction buffer (REABUF) and re-assayed. Please consider this dilution factor when calculating the results.

## 9. QUALITY CONTROL

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

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

### *Reference range*

Based on internal studies with serum samples of apparently healthy persons (n = 36) a mean value of 225 ng/ml was calculated. The standard deviation was 86 ng/ml.

**Serum mean value  $\pm$  2 x standard deviation:** **225  $\pm$  172 ng/ml**

**Normal range:** **53 – 397 ng/ml**

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### **Intra-assay (n = 8)**

| Sample | Serotonin [ng/ml] | CV [%] |
|--------|-------------------|--------|
| 1      | 171.5             | 8.4    |
| 2      | 80.3              | 12.1   |

#### **Inter-assay (n = 6)**

| Sample | Serotonin [ng/ml] | CV [%] |
|--------|-------------------|--------|
| 1      | 293.1             | 9.0    |
| 2      | 400.9             | 18.9   |

### Spiking recovery

Two serum samples were spiked with different serotonin concentrations and measured in this assay. The mean recovery rate was 102.5 % (n = 2).

| Sample [ng/ml] | Spike [ng/ml] | Serotonin expected [ng/ml] | Serotonin measured [ng/ml] | Recovery [%] |
|----------------|---------------|----------------------------|----------------------------|--------------|
| 180.6          | 100           | 280.6                      | 298.4                      | 106.3        |
| 180.6          | 200           | 380.6                      | 402.3                      | 105.7        |
| 100.3          | 100           | 200.3                      | 186.3                      | 93.0         |
| 100.3          | 200           | 300.3                      | 315.6                      | 105.1        |

### Dilution recovery

Two spiked serum samples were diluted with reaction buffer. The mean recovery was 99.4 % (n = 2).

| Sample [ng/ml] | Dilution | Serotonin expected [ng/ml] | Serotonin measured [ng/ml] | Recovery [%] |
|----------------|----------|----------------------------|----------------------------|--------------|
| 175.1          | 1:2      | 87.6                       | 92.5                       | 105.6        |
| 175.1          | 1:4      | 43.8                       | 48.0                       | 109.5        |
| 246.8          | 1:2      | 123.4                      | 114.0                      | 92.3         |
| 246.8          | 1:4      | 61.7                       | 55.7                       | 90.2         |

### Analytical sensitivity

The zero-standard was measured 36 times. The detection limit was set as  $B_0 - 2 \text{ SD}$  and estimated to be 2.3 ng/ml.

| Sample        | mean value [OD] | 2 x standard deviation (2 x SD) | Detection limit [ng/ml] |
|---------------|-----------------|---------------------------------|-------------------------|
| Zero-standard | 2.186           | 0.13                            | 2.3                     |

## Specificity

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

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| 3-Indoleacrylic acid  | < 0.01%  |
| Indole-3-pyruvic acid | < 0.04%  |
| 3-Indoleacetic acid   | < 0.05 % |
| 5-Methoxytryptophol   | < 0.08 % |
| L-5-OH-tryptophan     | < 0.01 % |

## 11. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- 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.
- DMF is toxic. It may cause harm to the unborn child and is harmful by inhalation and in contact with skin. Work under hood and apply preventive skin protection. In case of skin or eye contact flush with plenty of water and get medical attention.

## 12. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.

- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

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









- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK®* is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature, and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

### 14. REFERENCES

1. Badawy, A. a-B. Tryptophan: the key to boosting brain serotonin synthesis in depressive illness. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* **27**, 878–93 (2013).
2. Gershon, M. D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **20**, 14–21 (2013).
3. Gershon, M. D. Serotonin is a sword and a shield of the bowel: serotonin plays offense and defense. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **123**, 268–80; discussion 280 (2012).
4. Namkung, J., Kim, H. & Park, S. Peripheral Serotonin: a New Player in Systemic Energy Homeostasis. *Molecules and Cells* **38**, 1–6 (2015).

5. Park, H.-J., Lee, S.-E., Oh, J.-H., Seo, K.-W. & Song, K.-H. Leptin, adiponectin and serotonin levels in lean and obese dogs. *BMC veterinary research* **10**, 113 (2014).
6. Reigstad, C. S., Salmonson, C. E., Rainey, J. F., Szurszewski, J. H., Linden, D. R., Sonnenburg, J. L., Farrugia, G. & Kashyap, P. C. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *The FASEB Journal* **29**, 1395–1403 (2015).

**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                            |