

Product information

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



5-HIAA ELISA



DEE1900



96



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

Table of contents

1.	Introduction	4
1.1	Intended use and principle of the test	4
1.2	Clinical application	4
2.	Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations	4
2.1	Procedural cautions, guidelines and warnings	4
2.2	Limitations	5
2.2.1	Interfering substances and proper handling of specimens	5
2.2.2	Drug and food interferences	5
2.2.3	High-Dose-Hook effect	5
3.	Storage and stability	5
4.	Materials	5
4.1	Contents of the kit	5
4.2	Calibration and Controls	7
4.3	Additional materials required but not provided in the kit	7
4.4	Additional equipment required but not provided in the kit	7
5.	Sample collection, handling and storage	7
6.	Test procedure	8
6.1	Preparation of reagents and further notes	8
6.2	Predilution of standards, controls and samples	8
6.3	Methylation	8
6.4	5-HIAA ELISA	9
7.	Calculation of results	9
7.1	Expected reference value	9
7.2	Typical standard curve	10
8.	Control samples	10
9.	Assay characteristics	10
9.1	Performance data	10
9.2	Metrological Traceability	11
10.	References/Literature	12
11.	Changes	12
12.	Symbols used with Demeditec assays	13

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	14
1.1	Verwendungszweck und Testprinzip	14
1.2	Klinische Anwendung	14
2.	Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen	14
2.1	Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen	14
2.2	Grenzen des Tests	15
2.2.1	Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben	15
2.2.2	Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel	15
2.2.3	High-Dose-Hook Effekt	15
3.	Lagerung und Haltbarkeit	15
4.	Materialien	15
4.1	Reagenzien im Kit	15
4.2	Kalibratoren und Kontrollen	17
4.3	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien	17
4.4	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte	17
5.	Probensammlung, -behandlung und -lagerung	18
6.	Testdurchführung	18
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise	18
6.2	Vorverdünnung von Standards, Kontrollen und Proben	18
6.3	Methylierung	18
6.4	5-HIAA ELISA	19
7.	Berechnung der Ergebnisse	19
7.1	Erwartete Referenzbereiche	19
7.2	Typische Standardkurve	20
8.	Kontrollproben	20
9.	Assaycharakteristika	20
9.1	Leistungsdaten	20
9.2	Metrologische Rückführbarkeit	21
10.	Referenzen/Literatur	22
11.	Änderungen	22

1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of 5-Hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) in urine. The determination of 5-HIAA helps in the diagnosis of carcinoids.

The quantitative determination of 5-HIAA follows the basic principles of a competitive enzyme immunoassay.

First, 5-HIAA is chemically derivatized by a methylation step. The subsequent competitive ELISA uses the microtiter plate format. The antigen is bound to the solid phase of the microtiter plate. The methylated analyte in the standards, controls and samples compete with the solid phase bound analyte for a fixed number of antibody binding sites. After the system is in equilibrium, free antigen and free antigen-antibody complexes are removed by washing. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate resulting in a colour reaction. The reaction is monitored at a wavelength of 450 nm.

Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a reference curve prepared with known standard concentrations. Manual processing of the ELISA is recommended. The use of automatic laboratory equipment is the responsibility of the user. This in-vitro diagnostic is for professional use only.

1.2 Clinical application

5-Hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) is a metabolite of the serotonin pathway [1, 2]. Serotonin and its major urinary metabolite 5-HIAA, is produced in excess by most enterochromaffin cells from carcinoid tumors, especially those associated with the carcinoid syndrome. Several studies and publications show that analysis of urinary 5-HIAA is important in diagnosis of carcinoid patients [1-8].

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone, even if these results are assessed in accordance with the quality criteria of the method. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of the patient.

Only in cases where the laboratory results are in an acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient, it can be used for therapeutic consequences.

2. Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations

2.1 Procedural cautions, guidelines and warnings

- (1) This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and must be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for a certain type of sample as indicated in Intended Use (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) must be followed.
- (4) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (5) If serious incidents should occur in connection with this product, they should be reported to the manufacturer and the competent national authorities.
- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 – 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided. Microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up.
- (8) Standards, Controls and specimen samples should be assayed in duplicate.
- (9) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials, and devices are prepared for use at the appropriate time.
- (10) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (11) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (12) A standard curve must be established for each run.
- (13) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report provided with the kit.
- (14) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.

- (15) For information about hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (16) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.
- (17) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (18) In case of any severe damage to the test kit or components, the manufacturer has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components must not be used for a test run. They must be stored properly until the manufacturer decides what to do with them. If it is decided that they are no longer suitable for measurements, they must be disposed of in accordance with national regulations.
- (19) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but must be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.

2.2 Limitations

Any inappropriate handling of samples or modification of this test might influence the results.

2.2.1 Interfering substances and proper handling of specimens

Please note the sample collection! It cannot be excluded that high acid concentrations lead to incorrect results.

2.2.2 Drug and food interferences

Foods generally rich in serotonin such as bananas, pineapple, plums, kiwi fruit, tomatoes, avocados, various nuts, and chocolate should be avoided a few days before sample collection.

Drugs/substances such as imipramine, isoniazid, isocarboxazid, methyldopa, levodopa, MAO-inhibitors, general OTC-medication, alcohol, paracetamol, diazepam, oxprenolol, atenolol, phenothiazines, indomethacin, naproxen, reserpine, glyceryl-guaiacolate have an influence on urinary 5-HIAA levels and should be discontinued a few days before.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

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

4. Materials

4.1 Contents of the kit

BA D-0024	REAC-PLATE	Reaction Plate – ready to use
Content:	1 x 96 well plate, empty, in a resealable pouch	
BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil – ready to use
Content:	Adhesive foils in a resealable pouch	
Number:	1 x 4 foils	
BA E-0030	WASH-CONC	Wash Buffer Concentrate – concentrated 50x
	50x	
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, purple cap	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate – ready to use
Content:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
Description:	Species is goat	
Hazard pictograms:		
Signal word:	Warning	
Hazardous ingredients:	2-methyl-2H-isothiazol-3-one	

Hazard statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.
Precautionary statements:	P280 Wear protective gloves. P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.
BA E-0041	DILUENT Diluent – ready to use
Content:	Acidic buffer with non-mercury preservative
Volume:	1 x 22 ml/vial, white cap
BA E-0055	SUBSTRATE Substrate – ready to use
Content:	Chromogenic substrate containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide
Volume:	1 x 12 ml/vial, black cap
BA E-0080	STOP-SOLN Stop Solution – ready to use
Content:	0.25 M sulfuric acid
Volume:	1 x 12 ml/vial, grey cap
BA E-0931	SER 5-HIAA Serotonin 5-HIAA Microtiter Strips – ready to use
Content:	1 x 96 wells (12x8) antigen precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant
BA E-1910	5-HIAA-AS 5-HIAA Antiserum – ready to use
Content:	Rabbit anti-5-HIAA antibody, blue coloured
Volume:	1 x 6 ml/vial, blue cap
Description:	Species is rabbit
BA E-1913	ASSAY-BUFF Assay Buffer – ready to use
Content:	TRIS containing buffer with non-mercury preservative
Volume:	2 x 55 ml/vial, green cap
BA E-1937	METHYL-BUFF Methylation Buffer – ready to use
Content:	Methanol and dimethyl sulfoxide
Volume:	1 x 11 ml/vial, brown cap
Hazard pictograms:	  
Signal word:	Danger
Hazardous ingredients:	Methanol
Hazard statements:	H301+H311+H331 Toxic if swallowed, in contact with skin or if inhaled. H370 Causes damage to organs (eye, central nervous system).
Precautionary statements:	P260 Do not breathe fume/gas/mist/vapours/spray. P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection. P308+P311 IF exposed or concerned: Call a POISON CENTER or doctor. P403+P233 Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.
BA E-1939	METHYL-REAG Methylation Reagent – ready to use
Content:	Methylation reagent in hexane
Volume:	1 x 5 ml/vial, red cap
Hazard pictograms:	   
Signal word:	Danger
Hazardous ingredients:	Hexane, branched and linear, (Trimethylsilyl)diazomethane

Hazard statements:	H304 May be fatal if swallowed and enters airways.
	H330 Fatal if inhaled.
	H350 May cause cancer.
	H361f Suspected of damaging fertility.
	H370 Causes damage to organs (lungs, inhalation).
Precautionary statements:	P201 Obtain special instructions before use.
	P260 Do not breathe mist/vapours/spray.
	P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
	P304+P340 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.
	P310 Immediately call a POISON CENTER or doctor.
	P331 Do NOT induce vomiting.

4.2 Calibration and Controls

Standards and Controls – ready to use

Cat. no.	Component	Colour/ Cap	Concentration		Volume/ Vial
			[mg/l] 5-HIAA	[mmol/l] 5-HIAA	
BA E-1901	STANDARD A	white	0	0	4 ml
BA E-1902	STANDARD B	yellow	0.5	2.63	4 ml
BA E-1903	STANDARD C	orange	1.5	7.88	4 ml
BA E-1904	STANDARD D	blue	5	26.3	4 ml
BA E-1905	STANDARD E	grey	15	78.8	4 ml
BA E-1906	STANDARD F	black	50	262.5	4 ml
BA E-1951	CONTROL 1	green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range.		4 ml
BA E-1952	CONTROL 2	red			4 ml

Conversion: 5-HIAA [mg/l] x 5.25 = 5-HIAA [µmol/l]

Content: Acidic buffer spiked with defined quantity of 5-HIAA

4.3 Additional materials required but not provided in the kit

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

4.4 Additional equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 20 – 300 µl; 1 ml
- Microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 – 650 nm
- Microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Vortex mixer
- Ventilated hood

5. Sample collection, handling and storage

24-hour urine

24-hour urine sample is used for analysis. Over a defined period of 24 hours, all urine is collected in a bottle with acid (10 – 15 ml 6 M hydrochloric acid) provided for stabilization. During the collection period, the collected sample must always be stored in a cool place protected from light (2 – 8 °C). A creatinine determination for normalization is required.

Storage for a short period up to 7 days is at 2 – 8 °C. Storage for a longer period up to 6 months is at -20 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided. Avoid direct sunlight!

6. Test procedure

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

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

If the product is prepared in parts, unused wells in Reaction Plates should be covered to avoid contamination. After preparation, the used wells must be labelled to prevent double use.

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

⚠ *The Methylation Reagent is volatile. If possible, please pipette the Methylation Reagent with a repetitive pipette and make sure that the vial is recapped immediately after pipetting.*

6.1 Preparation of reagents and further notes

Wash Buffer

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

Storage: 2 months at 2 – 8 °C

Serotonin 5-HIAA Microtiter Strips

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

6.2 Predilution of standards, controls and samples

1. Pipette **50 µl** of **standards, controls** and **urine samples** into the respective wells of the **REAC-PLATE**.
2. Pipette **200 µl** of the **DILUENT** into all wells.
3. Shake for **1 min** at **RT** (20 – 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
20 µl are needed for the **methylation**.

6.3 Methylation

1. Pipette **20 µl** of the **prediluted standards, controls** and **urine samples** into the respective **reaction tubes**.
⚠ *The following steps 2 – 5 must be performed in a ventilated hood!*
 2. Pipette **100 µl** of **METHYL-BUFF** into all reaction tubes.
 3. Add **20 µl** of **METHYL-REAG** to each reaction tube and **mix each reaction tube immediately after addition of the Methylation Reagent.**
 4. Cover all reaction tubes and **methyate** for **20 min** at **RT** (20 – 25 °C).
 5. Pipette **1000 µl** of **ASSAY-BUFF** into all reaction tubes.
After this step the use of a ventilated hood is not necessary anymore!
- ⚠ **Proceed** with the **ELISA** (Chapter 6.4) **immediately** as the methylated standards, controls and samples are only stable for 1 hour!

6.4 5-HIAA ELISA

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

7. Calculation of results

Measuring range	5-HIAA
	0.4 – 50 mg/l

The standard curve, which can be used to determine the concentration of the unknown samples, is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis) using a concentration of 0.001 mg/l for Standard A (this alignment is mandatory because of the logarithmic presentation of the data). Use non-linear regression for curve fitting (e.g. 4-parameter, marquardt).

⚠ *This assay is a competitive assay. This means: the OD-values are decreasing with increasing concentrations of the analyte. OD-values found below the standard curve correspond to high concentrations of the analyte in the sample and have to be reported as being positive.*

Urine samples and controls

The concentrations of the samples and controls can be read directly from the standard curve. Samples found with concentrations higher than the highest standard (Standard F) should be diluted accordingly with water (deionized, distilled, or ultra-pure) and must be re-assayed. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

The amount of 5-HIAA normalized to creatinine is calculated as following:

mmol/mol creatinine = [5-HIAA (mg/l) x 191 (mg/mmol)] / [creatinine (mg/dl) x 113 (mg/mmol) x 100].

Conversion:

5-HIAA [mg/l] x 5.25 = 5-HIAA [µmol/l]

7.1 Expected reference value

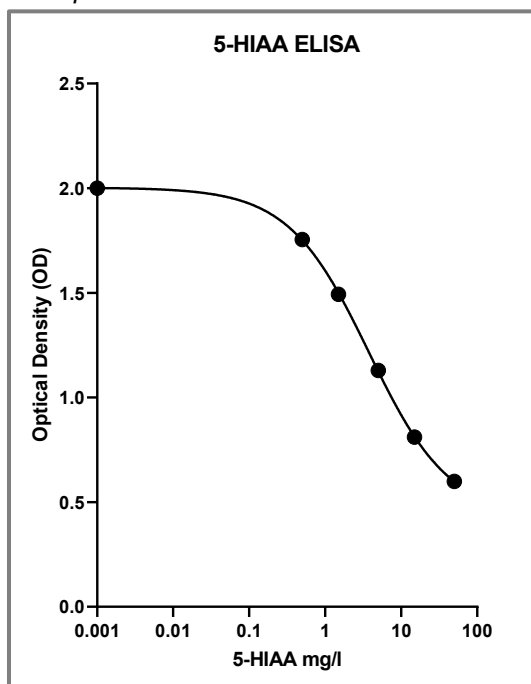
It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference values.

The expected reference value was determined in a study by Meijer et al 2000 [2]. Normalization is performed on creatinine, which is an indication of urinary dilution.

	5-HIAA in urine
Reference value (ULN)	2.8 mmol/mol creatinine
Typical pathological range	up to 380 mg/24h

7.2 Typical standard curve

⚠ Example: Do not use for calculation!



8. Control samples

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. Commercially obtained control samples should be treated like unknown samples. Control samples should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC-Report.

9. Assay characteristics

9.1 Performance data

Analytical Sensitivity	5-HIAA
Limit of Blank (LOB)	0.16 mg/l
Limit of Detection (LOD)	0.23 mg/l
Limit of Quantification (LOQ)	0.40 mg/l

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	
Substance	Cross Reactivity [%]
	5-HIAA
Serotonine	7.6
5-Hydroxy-DL-Tryptophane	2.3
Tryptamine	< 0.1
Melatonine	< 0.1
5-Methoxytryptamine	< 0.1
DL-Vanillic mandelic acid	< 0.1
Homovanillic acid	< 0.1

Precision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
n = 24			n = 9		
Sample	Mean ± SD [mg/l]	CV [%]	Sample	Mean ± SD [mg/l]	CV [%]
1	1.1 ± 0.15	13.3	1	11.3 ± 1.3	11.9
2	1.9 ± 0.18	9.3	2	4.8 ± 0.6	12.8
3	5.3 ± 0.48	9.0	3	3.1 ± 0.3	8.6
4	14.3 ± 1.2	8.7	4	7.3 ± 0.8	10.8
			5	19.0 ± 2.2	11.4

Lot-to-Lot					
	Sample	Reference Range [mg/l]	mean ± SD [mg/l]	mean ± SD Recovery [%]	CV [%]
5-HIAA in artificial matrix (n = 3)	1	3.0 – 7.0	4.9 ± 0.36	98.0 ± 7.2	7.4
	2	9.0 – 21.0	14.6 ± 1.3	97.3 ± 9.0	9.2

Recovery			
	Range [mg/l]	Range [%]	Mean [%]
Urine	0.8 – 40.5	86 – 93	90

Linearity			
	Serial dilution up to	Range [%]	Mean [%]
Urine	1:10	98 – 112	105

Method Comparison: ELISA vs. XLC-MS/MS [1]	
Urine	ELISA = 0.9749 * (XLC-MS/MS) – 0,0868; r ² = 0,98; n = 95

Diagnostic Performance [2]			
Diagnostic Specificity [%]	Diagnostic Sensitivity [%]	Positive Predictive Value (PPV) [%]	Negative Predictive Value (NPV) [%]
89	68	58	93
Positive Likelihood Ratio (LR+)		Negative Likelihood Ratio (LR-)	
6.2		0.36	

9.2 Metrological Traceability

The values assigned to the standards and controls of the 5-HIAA ELISA are traceable to SI Units by weighing with quality-controlled analyte.

Standards and Controls	Uncertainty [%]
	2.4

5-HIAA ELISA	Concentration [mg/l]	Expanded Uncertainty [%] k = 2*
	11.3	24.3
	4.8	26.0
	3.1	17.8
	7.3	22.1
	19.0	23.3

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

10. References/Literature

1. de Jong, W.H., et al., *Urinary 5-HIAA measurement using automated on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **868**(1-2): p. 28-33.
2. Meijer, W.G., et al., *Discriminating capacity of indole markers in the diagnosis of carcinoid tumors*. Clin Chem, 2000. **46**(10): p. 1588-96.
3. Formica, V., et al., *The prognostic role of WHO classification, urinary 5-hydroxyindoleacetic acid and liver function tests in metastatic neuroendocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic tract*. Br J Cancer, 2007. **96**(8): p. 1178-82.
4. Grouzmann, E., C. Centeno, and P.J. Eugster, *Quantification of vanillylmandelic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in urine using a dilute-and-shoot and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method*. Clin Chem Lab Med, 2018. **56**(9): p. 1533-1541.
5. Gut, P. and M. Ruchala, *Evaluation of 5-hydroxyindoleacetic acid excretion in urine in patients with small intestine neuroendocrine neoplasm and carcinoid syndrome treated with somatostatin analogues*. Neuro Endocrinol Lett, 2019. **40**(7-8): p. 315-318.
6. Padelli, M., et al., *[Determination of thresholds values for platelet serotonin and urinary 5-HIAA concentrations for the biological diagnosis of digestive neuroendocrine tumors]*. Ann Biol Clin (Paris), 2019. **77**(2): p. 161-168.
7. Tirosh, A., et al., *Prognostic Utility of 24-Hour Urinary 5-HIAA Doubling Time in Patients With Neuroendocrine Tumors*. Endocr Pract, 2018. **24**(8): p. 710-717.
8. van der Horst-Schrivers, A.N., et al., *Persistent low urinary excretion of 5-HIAA is a marker for favourable survival during follow-up in patients with disseminated midgut carcinoid tumours*. Eur J Cancer, 2007. **43**(18): p. 2651-7.

For updated literature or any other information please contact your local supplier.

The summary of safety and performance according to article 29 of regulation (EU) 2017/746 can be requested at info@demeditec.com.

11. Changes

Version	Release Date	Chapter	Change
17.0	2022-05-17	All	- The IFU was revised according to the IVDR regulation (EU) 2017/746
		1.	- Introduction
		2.1	- Procedural notes, guidelines and warnings
		2.2.2	- Drug and food interferences
		5.	- Sample collection and storage
		7.	- Measuring range, expected reference value and typical standard curve have been updated
		9.1	- Performance data updated and Lot-to-Lot added
		9.2	- Metrological traceability added
		10.	- References/Literature updated
		11.	- Changes added
18.0	2023-09-13	4.1	- Hazard labelling updated according to SDS
		4.1	- BA E-1939 Methylation Reagent now with black cap
19.0	2023-11-14	4.1	- BA E-1939 Volume and cap colour changed
20.0	2025-06-02	2.1	- Updated
		4.1	- BA E-0040: Hazard labelling updated according to SDS
		5	- Note added regarding creatinine determination
		7	- Note added to the dilution factor in the calculation and to creatinine
		9.2	- Metrological Traceability updated

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

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

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) in Urin. Die Bestimmung von 5-HIAA hilft bei der Diagnose von Karzinoiden.

Die quantitative Bestimmung von 5-HIAA folgt den Grundprinzipien eines kompetitiven Enzymimmunoassays.

Zunächst wird 5-HIAA durch einen Methylierungsschritt chemisch derivatisiert. Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist an die feste Phase der Mikrotiterplatte gebunden. Der methylierte Analyt in den Standards, Kontrollen und Proben und der an die Festphase gebundene Analyt konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die freien Antigene und die freien Antigen-Antikörperkomplexe durch Waschen entfernt. Der an die feste Phase gebundene Antikörper wird mit einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen-Antikörper gebunden und mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die Konzentrationen der unbekannten Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen und Abgleich der gemessenen Absorptionen ermittelt. Die manuelle Abarbeitung des ELISAs wird empfohlen. Die Verwendung von automatischen Laborgeräten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Dieses In-Vitro-Diagnostikum ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

1.2 Klinische Anwendung

5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) ist ein Metabolit des Serotoninweges [1, 2]. Serotonin und sein Hauptmetabolit im Urin, 5-HIAA, werden von den meisten enterochromaffinen Zellen von Karzinoid-Tumoren im Übermaß produziert, insbesondere von denen, die mit dem Karzinoid-Syndrom in Verbindung stehen. Mehrere Studien und Veröffentlichungen zeigen, dass die Analyse von 5-HIAA im Urin für die Diagnose von Karzinoid-Patienten wichtig ist [1-8].

Therapeutische Konsequenzen dürfen niemals allein auf Grund von Laborwerten herangezogen werden, auch wenn diese Werte in Übereinstimmung mit den Qualitätskriterien der Methode beurteilt werden. Jedes Laborergebnis trägt immer nur zu einem Teil des klinischen Bildes bei.

Nur wenn die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild stehen, dürfen daraus therapeutische Konsequenzen abgeleitet werden.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

- (1) Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Gebrauchsanweisung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter Verwendungszweck (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (4) Geeignete persönliche Schutzausrüstung (Kittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille) ist zu tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (5) Falls in Zusammenhang mit diesem Produkt schwerwiegende Vorfälle auftreten sollten, sollen diese dem Hersteller und den zuständigen nationalen Behörden gemeldet werden.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Verwenden Sie für Verdünnungs- oder Rekonstitutionszwecke deionisiertes, destilliertes oder ultrareines Wasser. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über einzeln herausnehmbare und abbrechbare Streifen. Ungenutzte Wells müssen bei 2 – 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden. Die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden, um Verwechslungen zu vermeiden.
- (8) Standards, Kontrollen und Proben sollten in Doppelbestimmung gemessen werden.
- (9) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (10) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Wells sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.

- (11) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (12) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (13) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen der Kitkontrollen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (14) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (15) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe das Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (16) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potenziell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
- (17) Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (18) Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen sachgerecht gelagert werden, bis der Hersteller entscheidet, wie mit ihnen zu verfahren ist. Sollte entschieden werden, dass sie für Messungen nicht mehr geeignet sind, müssen sie entsprechend den nationalen Richtlinien entsorgt werden.
- (19) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.

2.2 Grenzen des Tests

Jede unsachgemäße Behandlung der Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

2.2.1 Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben

Probenbehandlung beachten! Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein hoher Säuregehalt des Urins zu falschen Ergebnissen führt.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel

Auf allgemein serotoninreiche Lebensmittel wie Bananen, Ananas, Pflaumen, Kiwifrucht, Tomaten, Avocado, diverse Nüsse und Schokolade sollen einige Tage vor der Probensammlung verzichtet werden.

Medikamente bzw. Substanzen wie Imipramine, Isoniazid, Isocarboxazid, Methyldopa, Levodopa, MAO-Inhibitoren, allgemeine OTC-Medikation, Alkohol, Paracetamol, Diazepam, Oxprenolol, Atenolol, Phenothiazines, Indomethacin, Naproxen, Reserpine, Glycerin-Guiacolat haben Einfluss auf den 5-HIAA-Spiegel im Urin und sollen einige Tage zuvor abgesetzt werden.

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

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

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA D-0024	REAC-PLATE	Reaktionsplatte – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well-Platte, leer, in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA D-0090	FOILS	Selbstklebende Folie – gebrauchsfertig
Inhalt:	Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Anzahl:	1 x 4 Folien	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Waschpufferkonzentrat – 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel lila	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzymkonjugat – gebrauchsfertig

Inhalt:	Ziege anti-Kaninchen Immunglobuline, konjugiert mit Peroxidase
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot
Beschreibung:	Spezies ist Ziege
Gefahren- piktogramme:	
	GHS07
Signalwort:	Achtung
Gefährliche Inhaltsstoffe:	2-Methyl-2H-isothiazol-3-on
Gefahren- hinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
Sicherheits- hinweise:	P280 Schutzhandschuhe tragen. P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.
BA E-0041	DILUENT Verdünnungspuffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	Saurer Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel
Volumen:	1 x 22 ml/Fläschchen, Deckel weiß
BA E-0055	SUBSTRATE Substrat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz
BA E-0080	STOP-SOLN Stopplösung – gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel grau
BA E-0931	LI SER 5-HIAA Serotonin-5-HIAA-Mikrotiterstreifen – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Wells (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Beutel
BA E-1910	5-HIAA-AS 5-HIAA Antiserum – gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen anti-5-HIAA-Antikörper, blau gefärbt
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen, Deckel blau
Beschreibung:	Spezies ist Kaninchen
BA E-1913	ASSAY-BUFF Assaypuffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	TRIS-Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel
Volumen:	2 x 55 ml/Fläschchen, Deckel grün
BA E-1937	METHYL-BUFF Methylierungspuffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	Methanol und Dimethylsulfoxid
Volumen:	1 x 11 ml/Fläschchen, Deckel braun
Gefahren- piktogramme:	  
	GHS02 GHS06 GHS08
Signalwort:	Gefahr
Gefährliche Inhaltsstoffe:	Methanol
Gefahren- hinweise:	H301+H311+H331 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
Sicherheits- hinweise:	H370 Schädigt die Organe (Auge, zentrales Nervensystem). P260 Rauch, Gas, Nebel, Dampf, Aerosol nicht einatmen. P280 Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz tragen. P308+P311 BEI Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. P403+P233 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.

BA E-1939	<u>METHYL-REAG</u>	Methylierungsreagenz – gebrauchsfertig			
Inhalt:	Methylierungsreagenz in Hexan				
Volumen:	1 x 5 ml/Fläschchen, Deckel rot				
Gefahren- piktogramme:					
	GHS02	GHS06	GHS08	GHS09	
Signalwort:	Gefahr				
Gefährliche Inhaltsstoffe:	Hexane, verzweigt und linear, (Trimethylsilyl)diazomethan				
Gefahren- hinweise:	H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein. H330 Lebensgefahr bei Einatmen. H350 Kann Krebs erzeugen. H361f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. H370 Schädigt die Organe (Lunge, Inhalation).				
Sicherheits- hinweise:	P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P260 Nebel, Dampf, Aerosol nicht einatmen. P280 Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz, Gesichtsschutz tragen. P304+P340 BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. P310 Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM, Arzt anrufen. P331 KEIN Erbrechen herbeiführen.				

4.2 Kalibratoren und Kontrollen

Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration		Volumen/ Fläschchen
			[mg/l] 5-HIAA	[mmol/l] 5-HIAA	
BA E-1901	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA E-1902	STANDARD B	gelb	0,5	2,63	4 ml
BA E-1903	STANDARD C	orange	1,5	7,88	4 ml
BA E-1904	STANDARD D	blau	5	26,3	4 ml
BA E-1905	STANDARD E	grau	15	78,8	4 ml
BA E-1906	STANDARD F	schwarz	50	262,5	4 ml
BA E-1951	CONTROL 1	grün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Vertrauensbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.		4 ml
BA E-1952	CONTROL 2	rot			4 ml

Umrechnung: 5-HIAA (mg/l) x 5,25 = 5-HIAA (µmol/l)

Inhalt: Saurer Puffer aufgestockt mit einer definierten Menge 5-HIAA

4.3 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien

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

4.4 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 20 – 300 µl; 1 ml
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer mit 450 nm und, wenn möglich, 620 – 650 nm Filter zur Auswertung von Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplattenschüttler (Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm)
- Vortex-Mischer
- Abzug

5. Probensammlung, -behandlung und -lagerung

24-Stunden Sammelurin

Zur Analyse wird 24-Stunden Sammelurin verwendet. Über einen definierten Zeitraum von 24 Stunden wird sämtlicher Urin in einem Gefäß mit vorgelegter Säure (10 – 15 ml 6 M Salzsäure) zur Stabilisierung gesammelt. Während der Sammelperiode ist das gesammelte Probenmaterial stets kühl und lichtgeschützt zu lagern (2 – 8 °C). Eine Kreatininmessung zur Normalisierung ist erforderlich.

Die Lagerung für kurze Zeit bis zu 7 Tagen erfolgt bei 2 – 8 °C. Eine Lagerung für einen längeren Zeitraum bis zu

6 Monaten erfolgt bei -20 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Direktes Sonnenlicht vermeiden!

6. Testdurchführung

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

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

Wenn das Produkt in Teilen angesetzt wird, sollen nicht benötigte Wells in Reaktionsplatten abgedeckt werden, um Verschmutzungen zu vermeiden. Nach dem Ansatz müssen die benutzten Wells gekennzeichnet werden, damit eine Doppelnutzung ausgeschlossen wird.

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

⚠ Da das Methylierungsreagenz flüchtig ist, sollte es nach Möglichkeit mit einem Mehrfachdispenser pipettiert werden. Bitte achten Sie darauf, dass das Fläschchen mit Methylierungsreagenz direkt nach Verwendung wieder verschlossen wird.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise

Waschpuffer

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

Lagerung: 2 Monate bei 2 – 8 °C

Serotonin-5-HIAA-Mikrotiterstreifen

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

6.2 Vorverdünnung von Standards, Kontrollen und Proben

1. Jeweils **50 µl Standards, Kontrollen und Urinproben** in die entsprechenden Wells der **REAC-PLATE** pipettieren.
2. Jeweils **200 µl DILUENT** in alle Wells geben.
3. **1 min** bei **RT** (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
Jeweils **20 µl** werden für die nachfolgende Methylierungsreaktion benötigt.

6.3 Methylierung

1. Jeweils **20 µl** der **vorverdünnten Standards, Kontrollen und Urinproben** in die entsprechenden **Reaktionsröhrchen** pipettieren.
⚠ Die nachfolgenden Schritte 2 – 5 müssen in einem belüfteten Abzug durchgeführt werden!
 2. Jeweils **100 µl METHYL-BUFF** in alle Reaktionsröhrchen pipettieren.
 3. Jeweils **20 µl METHYL-REAG** in alle Reaktionsröhrchen geben und **jedes der Reaktionsröhrchen unmittelbar nach Zugabe des Methylierungsreagenzes mischen**.
 4. Die Reaktionsröhrchen abdecken und **20 min** bei **RT** (20 – 25 °C) inkubieren.
 5. Jeweils **1000 µl ASSAY-BUFF** in alle Reaktionsröhrchen pipettieren.
Nach diesem Schritt ist die Durchführung unter einem belüfteten Abzug nicht mehr notwendig!
- ⚠ Nach der Methylierung **umgehend** mit dem **ELISA** (6.4) fortfahren, da die methylierten Standards, Kontrollen und Proben maximal 1 Stunde stabil sind!

6.4 5-HIAA ELISA

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

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	5-HIAA
	0,4 – 50 mg/l

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannten Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standardabsorptionen (Berechnung der mittleren Absorption, linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) mit einer Konzentration von 0,001 mg/l für Standard A (diese Ausrichtung ist aufgrund der logarithmischen Darstellung der Daten erforderlich) erstellt. Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z. B.: 4-parameter, marquardt) verwendet.

⚠ *Dieser Assay ist ein kompetitiver Assay. Das bedeutet, dass die OD-Werte mit zunehmender Konzentration des Analyten sinken. OD-Signale, die unterhalb der Standardkurve liegen, entsprechen einer sehr hohen Konzentration des Analyten in der gemessenen Probe und müssen als positiv gewertet werden.*

Urinproben und Kontrollen

Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen können direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (Standard F) gefunden werden, müssen entsprechend mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

Die Menge an 5-HIAA, die zu Kreatinin normalisiert wird, wird wie folgt berechnet:

$$\text{mmol/mol Kreatinin} = [\text{5-HIAA (mg/l)} \times 191 \text{ (mg/mmol)}] / [\text{Kreatinin (mg/dl)} \times 113 \text{ (mg/mmol)} \times 100].$$

Umrechnung:

$$\text{5-HIAA [mg/l]} \times 5,25 = \text{5-HIAA [µmol/l]}$$

7.1 Erwartete Referenzbereiche

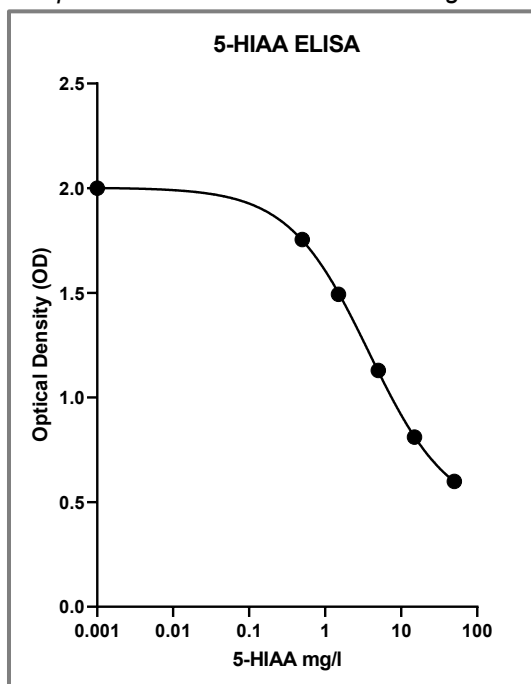
Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

Der erwartete Referenzwert wurde in einer internen Studie von Meijer et al 2000 [2] ermittelt. Die Normierung erfolgt auf Kreatinin, der einen Hinweis auf die Harnverdünnung gibt.

	5-HIAA in Urin
Referenzbereich (ULN)	2,8 mmol/mol Kreatinin
Typischer pathologischer Bereich	bis zu 380 mg/24h

7.2 Typische Standardkurve

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



8. Kontrollproben

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

9. Assaycharakteristika

9.1 Leistungsdaten

Analytische Sensitivität	5-HIAA
Limit of Blank (LOB)	0,16 mg/l
Limit of Detection (LOD)	0,23 mg/l
Limit of Quantification (LOQ)	0,40 mg/l

Analytische Spezifität (Kreuzreaktionen)	
Substanz	Kreuzreaktion [%]
	5-HIAA
Serotonin	7,6
5-Hydroxy-DL-Tryptophan	2,3
Tryptamin	< 0,1
Melatonin	< 0,1
5-Methoxytryptamin	< 0,1
DL-Vanillinmandelsäure	< 0,1
Homovanillinmandelsäure	< 0,1

Präzision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
n = 24			n = 9		
Probe	Mittelwert ± SD [mg/l]	CV [%]	Probe	Mittelwert ± SD	CV [%]
1	1,1 ± 0,15	13,3	1	11,3 ± 1,3	11,9
2	1,9 ± 0,18	9,3	2	4,8 ± 0,6	12,8
3	5,3 ± 0,48	9,0	3	3,1 ± 0,3	8,6
4	14,3 ± 1,2	8,7	4	7,3 ± 0,8	10,8
			5	19,0 ± 2,2	11,4

Lot-zu-Lot					
	Probe	Bereich [mg/l]	Mean ± SD [mg/l]	Mean ± SD Recovery [%]	CV [%]
5-HIAA in künstlicher Matrix (n = 3)	1	3,0 – 7,0	4,9 ± 0,36	98,0 ± 7,2	7,4
	2	9,0 – 21,0	14,6 ± 1,3	97,3 ± 9,0	9,2

Wiederfindung			
	Bereich [mg/l]	Bereich [%]	Mittelwert [%]
Urin	0,8 – 40,5	86 – 93	90

Linearität			
	Serielle Verdünnung bis	Bereich [%]	Mittelwert [%]
Urin	1:10	98 – 112	105

Methodenvergleich: ELISA vs. XLC-MS/MS [1]	
Urin	ELISA = 0,9749 * (XLC-MS/MS) – 0,0868; R ² = 0,98; n = 95

Klinische Leistung [2]			
Diagnostische Spezifität [%]	Diagnostische Sensitivität [%]	Positiver Prädiktiver Wert (PPV) [%]	Negativer Prädiktiver Wert (NPV) [%]
89	68	58	93
Positives Likelihood Ratio (LR+)		Negatives Likelihood Ratio (LR-)	
6,2		0,36	

9.2 Metrologische Rückführbarkeit

Die den Standards und Kontrollen des 5-HIAA ELISA zugewiesenen Werte sind durch Wägung mit qualitätskontrollierten Analyten auf SI-Einheiten rückführbar.

Standards und Kontrollen	Unsicherheit [%]
	2,4

5-HIAA ELISA	Konzentration [mg/l]	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
	11,3	24,3
	4,8	26,0
	3,1	17,8
	7,3	22,1
	19,0	23,3

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

10. Referenzen/Literatur

1. de Jong, W.H., et al., *Urinary 5-HIAA measurement using automated on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **868**(1-2): p. 28-33.
2. Meijer, W.G., et al., *Discriminating capacity of indole markers in the diagnosis of carcinoid tumors*. Clin Chem, 2000. **46**(10): p. 1588-96.
3. Formica, V., et al., *The prognostic role of WHO classification, urinary 5-hydroxyindoleacetic acid and liver function tests in metastatic neuroendocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic tract*. Br J Cancer, 2007. **96**(8): p. 1178-82.
4. Grouzmann, E., C. Centeno, and P.J. Eugster, *Quantification of vanillylmandelic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in urine using a dilute-and-shoot and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method*. Clin Chem Lab Med, 2018. **56**(9): p. 1533-1541.
5. Gut, P. and M. Ruchala, *Evaluation of 5-hydroxyindoleacetic acid excretion in urine in patients with small intestine neuroendocrine neoplasm and carcinoid syndrome treated with somatostatin analogues*. Neuro Endocrinol Lett, 2019. **40**(7-8): p. 315-318.
6. Padelli, M., et al., *[Determination of thresholds values for platelet serotonin and urinary 5-HIAA concentrations for the biological diagnosis of digestive neuroendocrine tumors]*. Ann Biol Clin (Paris), 2019. **77**(2): p. 161-168.
7. Tirosh, A., et al., *Prognostic Utility of 24-Hour Urinary 5-HIAA Doubling Time in Patients With Neuroendocrine Tumors*. Endocr Pract, 2018. **24**(8): p. 710-717.
8. van der Horst-Schrivers, A.N., et al., *Persistent low urinary excretion of 5-HIAA is a marker for favourable survival during follow-up in patients with disseminated midgut carcinoid tumours*. Eur J Cancer, 2007. **43**(18): p. 2651-7.

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

Der Kurzbericht über Sicherheit und Leistung gemäß Artikel 29 der Verordnung (EU) 2017/746 kann über die info@demeditec.de angefordert werden.

11. Änderungen

Version	Freigabedatum	Kapitel	Änderung
17.0	2022-05-17	Alle 1. 2.1 2.2.2 5. 7. 9.1 9.2 10. 11.	- Überarbeitung gemäß der Verordnung (EU) 2017/746 - Einleitung - Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen - Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel - Probenbehandlung und Lagerung - Messbereiche, Referenzbereiche und typische Standardkurve wurden aktualisiert - Assay-Charakteristika wurden aktualisiert und Lot-zu-Lot hinzugefügt - Metrologische Rückführbarkeit wurde hinzugefügt - Referenzen wurden aktualisiert - Änderungen wurden hinzugefügt
18.0	2023-09-13	4.1 4.1	- Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert - BA E-1939 Methylierungsreagenz Deckel schwarz
19.0	2023-11-14	4.1	- BA E-1939 Volumen und Deckelfarbe geändert
20.0	2025-06-02	2.1 4.1 5 7 9.2	- Aktualisiert - BA E-0040: Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert - Anmerkung zur Kreatininbestimmung hinzugefügt - Anmerkung zum Verdünnungsfaktor bei der Berechnung und zu Kreatinin hinzugefügt - Metrologische Rückführbarkeit aktualisiert

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

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