

Instructions for use / Gebrauchsanweisung

5-HIAA ELISA

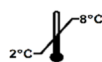
REF**BA E-1900****IVD**

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 and storage	8
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.	Quality control	10
9.	Assay characteristics	10
9.1	Performance data	10
9.2	Metrological Traceability	11
10.	References/Literature	11
11.	Changes	12

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	13
1.1	Verwendungszweck und Testprinzip	13
1.2	Klinische Anwendung	13
2.	Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen	13
2.1	Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen	13
2.2	Grenzen des Tests	14
2.2.1	Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben	14
2.2.2	Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel	14
2.2.3	High-Dose-Hook Effekt	14
3.	Lagerung und Haltbarkeit	14
4.	Materialien	14
4.1	Reagenzien im Kit	14
4.2	Kalibratoren und Kontrollen	16
4.3	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien	16
4.4	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte	17
5.	Probenbehandlung und Lagerung	17
6.	Testdurchführung	17
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und Hinweise	17
6.2	Vorverdünnung von Standards, Kontrollen und Proben	17
6.3	Methylierung	18
6.4	5-HIAA ELISA	18
7.	Berechnung der Ergebnisse	18
7.1	Erwartete Referenzbereiche	19
7.2	Typische Standardkurve	19
8.	Kontrollproben	19
9.	Assaycharakteristika	19
9.1	Leistungsdaten	19
9.2	Metrologische Rückführbarkeit	20
10.	Referenzen/Literatur	21
11.	Änderungen	21

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 fixed to the solid phase of the microtiter plate. The methylated analyte in the standards, controls and samples and the solid phase bound analyte compete for a fixed number of antibody binding sites. After the system has reached equilibrium, free antigen and free antigen-antibody complexes are removed by washing step. The antibody bound to the solid phase is detected by a peroxidase-labeled anti-rabbit IgG using TMB as a chromogenic substrate. The reaction is monitored at 450 nm.

By means of a standard curve the 5-HIAA concentrations in the samples are determined. Manual processing 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) Duplicate determination of sample is highly recommended.
- (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) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (16) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water.
- (17) 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.
- (18) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.
- (19) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (20) 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.
- (21) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but have to 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 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 has been opened, care should be taken to close it tightly again including the desiccant. Make sure that the Methylation Reagent is recapped immediately after pipetting.

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 50x	Wash Buffer Concentrate – concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, purple cap	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate – ready to use
Content:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
Description:	Species is goat	

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	
Hazards identification:	 H290 May be corrosive to metals.	
BA E-0931	SER 5-HIAA	Serotonin 5-HIAA Microtiter Strips – ready to use
Content:	1 x 96 well (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	
Hazards identification:	   H225 Highly flammable liquid and vapour. H331 Toxic if inhaled. H370 Causes damage to organs.	

BA E-1939 **METHYL-REAG** **Methylation Reagent** – ready to use

Content: Methylation reagent in hexane

Volume: 1 x 2.25 ml/vial, white cap

Hazards identification:



H304 May be fatal if swallowed and enters airways.

H350 May cause cancer.

H315 Causes skin irritation.

H330 Fatal if inhaled.

H361f Suspected of damaging fertility.

H373 May cause damage to organs.

H411 Toxic to aquatic life with long lasting effects.

H336 May cause drowsiness or dizziness.

H225 Highly flammable liquid and vapour.

H370 Causes damage to organs.

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

- Reaction tubes (polypropylene tubes 3.5 ml) and suitable rack
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)

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 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 and the total volume is noted for evaluation of the results. During the collection period, the collected sample must always be stored in a cool place protected from light (2 – 8 °C).

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. Determinations in duplicate are recommended. Number the microwell plates (microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up).

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 and 25 °C.

If the product is prepared in parts, unused wells in Reaction and Extraction Plates should be covered to avoid contamination. After preparation, the used wells must be labeled 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 methylate 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 methyalted 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 FOIL 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 FOIL 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 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 **urine samples** and **the 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.

The total amount of 5-HIAA excreted in urine during 24 h is calculated as following:

$$\text{mg/24h} = \text{mg/l} \times \text{l/24h}.$$

Conversion: 5-HIAA (mg/l) $\times$ 5.25 = 5-HIAA (µmol/l)

7.1 Expected reference value

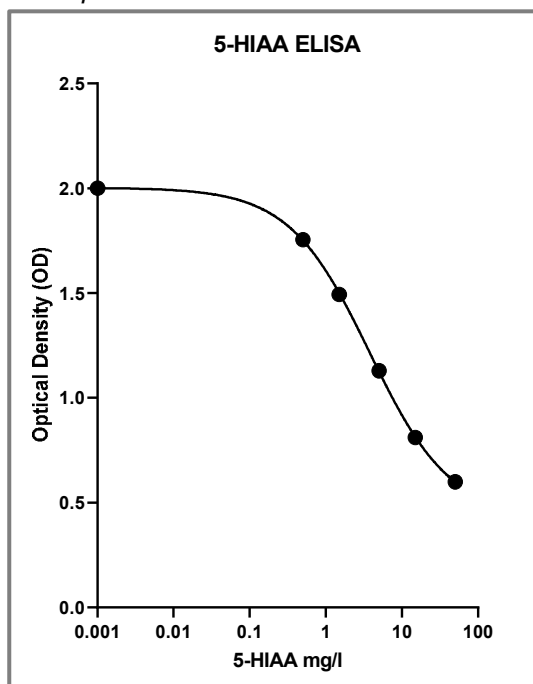
It is strongly recommended that each laboratory should determine its own reference values.

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. Quality control

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 printed on the QC-Report.

9. Assay characteristics

9.1 Performance data

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

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

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

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

Method comparison versus XLC-MS/MS [1]	Urine	ELISA = 0.9749 * (XLC-MS/MS) – 0,0868; $r^2 = 0,98$; n = 95
---	-------	--

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

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 calibrated weighing with quality-controlled analyte.

Standards and Controls	Uncertainty [%]
	1.2

5-HIAA ELISA	
Sample	Expanded Uncertainty [%] k = 2*
1	23.9
2	25.7
3	17.4
4	21.7
5	22.9

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

10. References/Literature

- 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.
- 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 downloaded from the website www.ldn.de.

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

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

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 anschließende kompetitive ELISA verwendet das Mikrotiterplattenformat. Das Antigen wird an der festen Phase der Mikrotiterplatte fixiert. Der methylierte Analyt in den Standards, Kontrollen und Proben und der an die feste Phase gebundene Analyt konkurrieren um eine bestimmte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Nachdem das System ein Gleichgewicht erreicht hat, werden freies Antigen und freie Antigen-Antikörper Komplexe durch einen Waschschrift entfernt. Der an die feste Phase gebundene Antikörper wird mit einem Peroxidase-markierten anti-Kaninchen Antikörper unter Verwendung von TMB als chromogenes Substrat nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen.

Mit Hilfe einer Standardkurve werden die 5-HIAA Konzentrationen in den Proben bestimmt. Eine manuelle Bearbeitung wird empfohlen. Der Einsatz von Laborautomaten 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 sollten niemals allein auf Laborergebnissen beruhen, auch wenn diese Ergebnisse nach den Qualitätskriterien der Methode bewertet werden. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes des Patienten.

Nur in den Fällen, in denen die Laborergebnisse eine akzeptable Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild des Patienten aufweisen, können sie für therapeutische Konsequenzen herangezogen 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) 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) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (16) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (17) 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.
- (18) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potenziell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
- (19) Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzintervalle erstellt.
- (20) 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.
- (21) 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 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 Immunglobulins konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot	
Beschreibung:	Spezies Ziege	
BA E-0041	DILUENT	Verdünnungspuffer – gebrauchsfertig
Content:	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	
Gefährdung:	 H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.	
BA E-0931	W SER 5-HIAA	Serotonin-5-HIAA Mikrotiterstreifen – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 well (12x8) Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Folienbeutel	
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 Kaninchen	
BA E-1913	ASSAY-BUFF	Assaypuffer – gebrauchsfertig
Content:	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

Gefährdung:



H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H331 Giftig bei Einatmen.

H370 Schädigt die Organe.

BA E-1939 METHYL-REAG Methylierungsreagenz – gebrauchsfertig

Inhalt: Methylierungsreagenz in Hexan

Volumen: 1 x 2,25 ml/Fläschchen, Deckel weiß

Gefährdung:



H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.

H350 Kann Krebs erzeugen.

H315 Verursacht Hautreizungen.

H330 Lebensgefahr bei Einatmen.

H361f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.

H373 Kann die Organe schädigen.

H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H370 Schädigt die Organe.

4.2 Kalibratoren und Kontrollen**Standards and Kontrollen – gebrauchsfertig**

Artikel-nummer	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	Siehe QC-Report für den erwarteten Wert und den akzeptablen Bereich!		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

- Reaktionsröhrchen (Polypropylen Röhrchen 3,5 ml) mit passendem Ständer
- saugfähige Unterlage
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)

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. Probenbehandlung 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 und das Gesamtvolumen für die spätere Auswertung der Ergebnisse notiert. Während der Sammelperiode ist das gesammelte Probenmaterial stets kühl und lichtgeschützt zu lagern (2 – 8 °C). 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. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen. Um eventuelle Verwechslungen der Mikrotiterstreifen zu vermeiden, wird empfohlen, diese vor Verwendung zu nummerieren.

Die Reaktion des Antikörpers, des 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 Reaktions- und Extraktionsplatten 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 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.
⚠	<i>Die nachfolgenden Schritte 2 – 5 müssen in einem belüfteten Abzug durchgeführt werden!</i>
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. <i>Nach diesem Schritt ist die Durchführung unter einem belüfteten Abzug nicht mehr notwendig!</i>
⚠	<i>Nach der Methylierung umgehend mit dem ELISA (6.4) fortfahren, da die methylierten Standards, Kontrollen und Proben maximal 1 Stunde stabil sind!</i>

6.4 5-HIAA ELISA

1.	Jeweils 25 µl der methylierten Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells der W SER 5-HIAA pipettieren.
2.	Jeweils 50 µl 5-HIAA-AS in alle Wells pipettieren.
3.	Platte mit FOIL abdecken und 1 h bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	FOIL 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 Kavitäten pipettieren.
6.	Die ELISA-Platte mit FOIL abdecken und 1 h bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (600 rpm) inkubieren.
7.	FOIL 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 (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) unter Verwendung 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 F gefunden werden, müssen

entsprechend mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) verdünnt und nochmals bestimmt werden.

Die Gesamtmenge an 5-HIAA, die innerhalb von 24 Stunden im Urin ausgeschieden wird, wird wie folgt berechnet: $\text{mg}/24\text{h} = \text{mg}/\text{l} \times \text{l}/24\text{h}$

Umrechnung: $5\text{-HIAA (mg/l)} \times 5.25 = 5\text{-HIAA } (\mu\text{mol/l})$

7.1 Erwartete Referenzbereiche

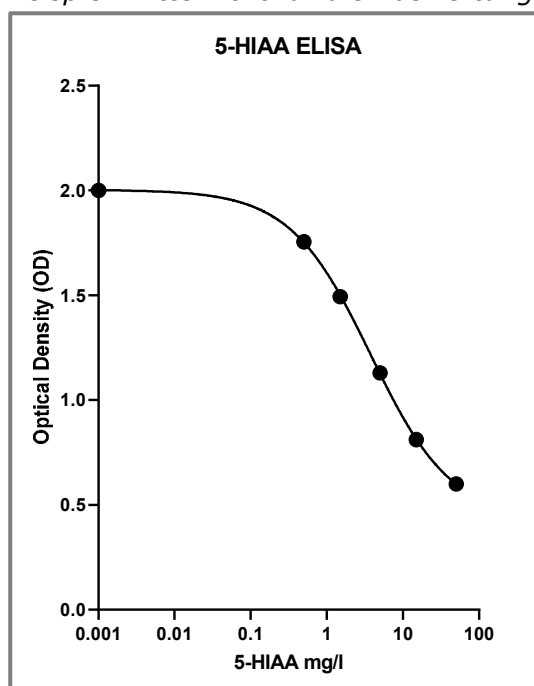
Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzwert ermittelt.

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, mit jeder Testserie entweder die Kitkontrollen und/oder andere kommerzielle Kontrollproben im normalen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Diese Kontrollen werden wie Proben eingesetzt. Sie müssen innerhalb des Vertrauensbereichs liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

9. Assaycharakteristika

9.1 Leistungsdaten

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

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

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

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

Methodenvergleich versus XLC-MS/MS [1]	Urin	$ELISA = 0,9749 * (XLC-MS/MS) - 0,0868; R^2 = 0,98; n = 95$
---	------	---

Inter-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

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 geeichte Wägung mit qualitätskontrolliertem Analyten auf SI-Einheiten rückführbar.

Standards und Kontrollen	Unsicherheit [%]
	1,2

5-HIAA ELISA	
Probe	Erweiterte Unsicherheit [%] k = 2*
1	23,9
2	25,7
3	17,4
4	21,7
5	22,9

*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. Ruchała, 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 Website www.ldn.de heruntergeladen werden.

11. Änderungen

Version	Freigabedatum	Kapitel	Änderung
17.0	2022-05-17	Alle	– Überarbeitung gemäß der Verordnung (EU) 2017/746
		1.	– Einleitung
		2.1	– Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen
		2.2.2	– Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel
		5.	– Probenbehandlung und Lagerung
		7.	– Messbereiche, Referenzbereiche und typische Standardkurve wurden aktualisiert
		9.1	– Assay-Charakteristika wurden aktualisiert und Lot-zu-Lot hinzugefügt
		9.2	– Metrologische Rückführbarkeit wurde hinzugefügt
		10.	– Referenzen wurden aktualisiert
		11.	– Änderungen wurden hinzugefügt

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt		CE-Kennzeichnung
	Achtung		Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				