
Instructions for use

5-HIAA ELISA

REF

DEE1900



IVD



1. Introduction**1.1 Intended use and principle of the test**

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of 5-Hydroxy-3-Indole Acetic Acid (5-HIAA) in urine.

First, 5-HIAA is derivatized by methylation. 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 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. The antibody bound to the solid phase is detected by an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate using TMB as a substrate. The reaction is monitored at 450 nm. Quantification of unknown samples is achieved by comparing their absorbance with a standard curve prepared with known standard concentrations.

1.2 Clinical application

5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid) is the major urinary metabolite of serotonin, an ubiquitous bioactive amine. Serotonin, and consequently 5-HIAA, is produced in excess by most carcinoid tumors, especially those associated with the carcinoid syndrome. The syndrome includes flushing and diarrhea, and, less frequently, heart failure and bronchoconstriction. Quantitation of urinary 5-HIAA is therefore intended to test for carcinoid.

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as under point "Procedural cautions, guidelines and warnings". 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.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any 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 has to 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) Reagents of this kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- (4) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (5) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (8) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided.
- (9) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (10) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.
- (11) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (12) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- (13) A standard curve must be established for each run.
- (14) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report.
- (15) 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.
- (16) 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.

- (17) Some reagents contain sodium azide (NaN₃) as preservative. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water. NaN₃ may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. When disposing reagents, flush with a large volume of water to avoid azide build-up.
- (18) 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. Wash contaminated objects before reusing them.
- (19) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheet (MSDS). The Material Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (20) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (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.
- (22) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed according to national regulations.

2.2 Limitations

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

2.2.1 Interfering substances

24-hour urine

Please note the sample preparation! If the percentage of the final concentration of acid is too high, 5-HIAA is not methylated adequately.

2.2.2 Drug interferences

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of 5-HIAA level in the sample.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3. Storage and stability

Store the unopened 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 1 month when stored at 2 - 8 °C. Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly with desiccant again.

4. Materials

4.1. Content of the kit

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Ready to use
Contents:	Adhesive Foils in a resealable pouch	
Volume:	1 x 4 foils	
BA D-0023	REAC-TUBES	Reaction Tubes - Ready to use
Contents:	2 x 50 tubes in a resealable pouch	
BA D-0024	REAC-PLATE	Reaction Plate - Ready to use
Contents:	1 x 96 well plate, empty in a resealable pouch	
BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate - Concentrated 50x
Contents:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, light purple cap	
BA E-0040	CONJUGATE	Enzyme Conjugate - Ready to use
Contents:	Goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 12 ml/vial, red cap	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate - Ready to use
Contents:	Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 ml/black vial, black cap	

BA E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution** - Ready to use

Contents: 0.25 M sulfuric acid
 Volume: 1 x 12 ml/vial, light grey cap

BA E-0931 **SER 5-HIAA** **5-HIAA Microtiter Strips** - Ready to use

Contents: 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

Contents: Rabbit anti – 5-HIAA antibody, blue coloured
 Volume: 1 x 6 ml/vial, blue cap

Standards and Controls - Ready to use

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

Conversion: 5-HIAA (mg/l) x 5.25 = 5-HIAA (μ mol/l)
 Contents: Acidic buffer spiked with defined quantity of 5-HIAA

BA E-0041 **DILUENT** **Diluent** – Ready to use

Contents: Acidic buffer with non-mercury preservatives
 Volume: 1 x 22 ml/vial, white cap

BA E-1913 **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** – Ready to use

Contents: TRIS containing buffer with non-mercury preservative
 Volume: 2 x 55 ml/vial, dark green cap

BA E-1937 **METHYL-BUFF** **Methylation Buffer** - Ready to use

Contents: Methanol and dimethylformamide
 Volume: 1 x 11 ml/vial, brown cap

Hazards identification: 

H225 Highly flammable liquid and vapour.
 H360 May damage fertility or the unborn child.
 H370 Causes damage to organs.
 H319 Causes serious eye irritation.
 H301 + H311 + H331 Toxic if swallowed, in contact with skin or if inhaled.

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

Contents: Methylation reagent in diethyl ether

Volume: 1 x 2.25 ml, white cap

Hazards

identification:



H225 Highly flammable liquid and vapour.

H302 Harmful if swallowed.

H370 Causes damage to organs.

H330 Fatal if inhaled.

H336 May cause drowsiness or dizziness.

H350 May cause cancer.

4.2 Additional materials and 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)
- Absorbent material (paper towel)
- Ventilated hood
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Vortex mixer

5. Sample collection and storage

Spontaneous urine or 24-hour urine, collected in a bottle containing 10 - 15 ml of 6 M HCl, can be used.

If 24-hour urine is used please record the total volume of the collected urine. If the final concentration of acid is too high, 5-HIAA is not methylated adequately.

Storage: for longer periods (up to 6 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided. Avoid exposure to direct sunlight.

6. Test procedure

Allow all reagents to reach room temperature and mix thoroughly by gentle inversion before use. Duplicate determinations are recommended.

The binding of the antisera and the enzyme conjugates and the activity of the enzyme used are temperature dependent, and the absorption values may vary if a thermostat is not used. 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.



In case of overflow, read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 405 nm

6.1 Preparation of reagents

Wash Buffer



Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate with water (deionized, distilled, or ultra-pure) to a final volume of 1000 ml.

Storage: 1 month at 2 - 8 °C


6.2 Predilution of the standards, controls and samples

1. Pipette **50 µl** of **standards, controls** and **urine samples** into the respective wells of the **Reaction 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 .  <i>The following steps 2-5 have to be performed in a ventilated hood!</i>
2.	Pipette 100 µl of Methylation Buffer into all tubes.
3.	Add 20 µl of Methylation Reagent to each tube and mix each tube immediately after addition of the Methylation Reagent .
4.	Cover all tubes and methylate for 20 min at RT (approx. 20 °C).
5.	Pipette 1000 µl of Assay Buffer into all tubes. <i>After this step the use of a ventilated hood is not necessary any more!</i>
	Proceed with the ELISA (Chapter 6.4) immediately as the methylated standards, controls and samples are only stable for 1 h!

6.4 5-HIAA ELISA

1.	Pipette 25 µl of the methylated standards, controls and samples into the appropriate wells of the 5-HIAA Microtiter Strips .
2.	Pipette 50 µl of the 5-HIAA Antiserum into all wells.
3.	Cover plate with Adhesive 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 x 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 Enzyme Conjugate into all wells.
6.	Cover plate with Adhesive 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 x 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 Solution to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
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
	0.17 – 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). Use a non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).

Urine samples and controls

The concentrations of the **urine samples** and the **controls** can be read directly from the standard curve.

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

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

Expected reference value

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

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the 5-HIAA ELISA the following value is observed:

Expected Reference Value	5-HIAA
	< 15 mg/day

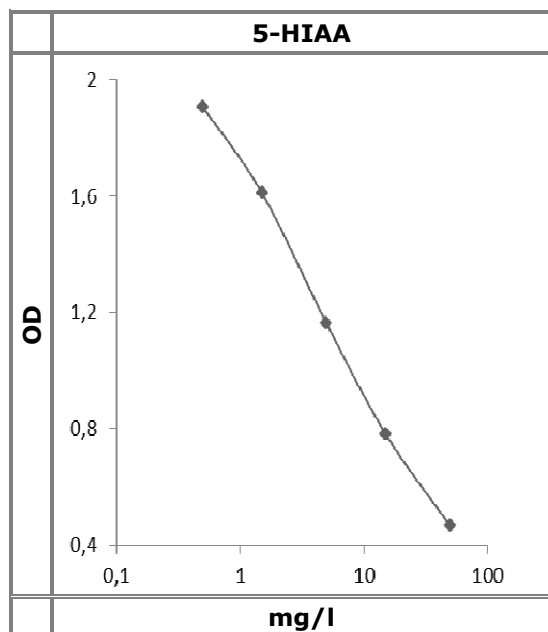
7.1 Quality control

It is recommended to use control samples according national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. The kit controls, or other commercially available controls, should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are indicated on the QC-Report.

7.2 Typical standard curve



Example, do not use for calculation!



8. Assay characteristics

Analytical Sensitivity (Limit of Detection)	5-HIAA
	0.17 mg/l

Analytical Specificity (Cross Reactivity)	Substance	Cross Reactivity (%)
		5-HIAA
	5-HIAA	100
	Serotonin	5.5
	5-Hydroxy-DL-Tryptophan	1.8
	Tryptamine	< 0.1
	Melatonin	< 0.1
	5-Hydroxytryptamin	< 0.1
	Vanillic mandelic acid	< 0.1
	Homovanillic Acid	< 0.1

Precision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample	Range (mg/l)	CV (%)	Sample	Range (mg/l)	CV (%)
1 n = 40	1.7 ± 0.2	14.1	1 n = 9	3.1 ± 0.3	8.6
2 n = 38	6.6 ± 0.6	8.6	2 n = 9	7.3 ± 0.8	10.8
3 n = 40	18.4 ± 1.9	10.3	3 n = 9	19 ± 2.2	11.4

Linearity		Range	Serial dilution up to	Range (%)
	5-HIAA	2.4 - 24.3 mg/l	1:10	98 - 112

Recovery		Mean (%)	Range (%)	% Recovery after spiking
	5-HIAA	101	93 - 111	







Method Comparison versus HPLC	5-HIAA	HPLC = 0.9 ELISA + 0.2	r = 0.99; n = 47
--------------------------------------	--------	------------------------	------------------

9. References/Literature

- (1) Beer et al. Acupuncture for Hot Flashes in Patients With Prostate Cancer Patients. *Urology*, 76(5):1182-1188 (2010)
- (2) Korse et al. Chromogranin A as an Alternative to 5-Hydroxyindoleacetic Acid in the Evaluation of Symptoms during Treatment of Patients with Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology*, 89:296-301 (2008)
- (3) van Tuyl et al. Detection of small-bowel neuroendocrine tumors by video capsule endoscopy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 64 (1):66-72 (2006)

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

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	LOT	Batch code	IVD	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE labelled
	Caution	REF	Catalogue number	RUO	For research use only!

1. Einleitung**1.1 Verwendungszweck und Testprinzip**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung der 5-Hydroxy-3-Indolessigsäure (5-HIAA) in Urin.

Im Verlauf der Probenvorbereitung wird die 5-HIAA quantitativ methyliert. Der sich anschließende kompetitive ELISA basiert auf dem Mikrotiterplattenformat. Das Antigen ist als feste Phase an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Die derivatisierten Analyten in den Standards, Kontrollen und Proben und die an die Festphase gebundenen Antigene konkurrieren um die vorhandenen Bindungsstellen der Antikörper. Nachdem das System im Gleichgewicht ist, werden die ungebundenen Antigene und Antigen-Antikörper-Komplexe durch Waschen entfernt. Der an die Festphase gebundene Antikörper wird mit einem Peroxidase konjugierten Antikörper erkannt und anschließend mit TMB als Substrat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei 450 nm gemessen.

Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden mit Hilfe einer Standardkurve und Abgleich der gemessenen Absorption ermittelt.

1.2 Klinische Anwendung

5-Hydroxyindolylessigsäure (5-HIAA) ist der Hauptmetabolit des ubiquitär bioaktiven Amins Serotonin im Urin. Serotonin und folglich auch 5-HIAA werden von Karzinoiden bzw. neuroendokrinen Tumoren des Karzinoidsyndroms im starken Überschuss sekretiert. Das Krankheitsbild des Karzinoidsyndroms wird mit Hitzewallungen, Diarrhöe und weniger häufig Herzversagen und Bronchokonstriktion beschrieben. Die Diagnose auf ein Karzinoid kann über die Bestimmung von 5-HIAA im Urin erfolgen.

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.

Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen**2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen**

- (1) Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch bestimmt. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung 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 humanes Serum oder Plasma enthaltenden Reagenzien des Kits wurden mit geprüften Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Dennoch sollten sämtliche Reagenzien bei der Handhabung und Entsorgung als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandelt werden.
- (4) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (5) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.
- (8) Die Mikrotiterplatte verfügt über abbrechbare Streifen. Ungenutzte Kavitäten müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
- (9) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (10) 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.
- (11) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Kavitäten sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.

- (12) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (13) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (14) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen für die Kitkontrollen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (15) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (16) 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.
- (17) Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (NaN₃) als Konservierungsmittel. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen. NaN₃ kann mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung der Reagenzien mit reichlich Wasser spülen, um die Ansammlung von Azid zu vermeiden.
- (18) 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.
- (19) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe Sicherheitsdatenblatt (MSDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (20) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.
- (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.
- (22) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

2.2 Grenzen des Tests

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

2.2.1 Interferenzen Sammelurin

Probenvorbereitung beachten! Ist der Säuregehalt des 24h-Sammelurins zu hoch, wird die 5-HIAA nicht ausreichend methyliert.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des 5-HIAA-Gehaltes in der Probe beeinflusst.

2.2.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufzubewahren. Die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 1 Monat stabil, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien

4.1. Reagenzien im Kit

BA D-0090	FOILS	Adhesive Foil - Gebrauchsfertig
Inhalt:	4 Klebefolien in einem wiederverschließbaren Beutel	
Volume:	1 x 4 Folien	
BA D-0023	REAC-TUBES	Reaction Tubes - Gebrauchsfertig
Inhalt:	2 x 50 Röhrchen in einem wiederverschließbaren Beutel	
BA D-0024	REAC-PLATE	Reaction Plate - Gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well Platte, leer, in einem wiederverschließbaren Beutel	

- BA E-0030** **WASH-CONC 50x** **Wash Buffer Concentrate - 50x** konzentriert
 Inhalt: Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH
 Volumen: 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila
- BA E-0040** **CONJUGATE** **Enzyme Conjugate** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Ziege Anti-Kaninchen Immunglobulin konjugiert mit Peroxidase
 Volumen: 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel rot
- BA E-0055** **SUBSTRATE** **Substrate** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Chromogenes Substrat mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid
 Volumen: 1 x 12 ml/Fläschchen schwarz, Deckel schwarz
- BA E-0080** **STOP-SOLN** **Stop Solution** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 0,25 M Schwefelsäure
 Volumen: 1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel hellgrau
- BA E-0931** **SER 5-HIAA** **5-HIAA Microtiter Strips** - 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

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

ArtikelNr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration mg/l	Konzentration $\mu\text{mol/l}$	Volumen/Fläschchen
BA E-1901	STANDARD A	weiß	0	0	4 ml
BA E-1902	STANDARD B	hellgelb	0,5	2,63	4 ml
BA E-1903	STANDARD C	orange	1,5	7,88	4 ml
BA E-1904	STANDARD D	dunkelblau	5	26,3	4 ml
BA E-1905	STANDARD E	hellgrau	15	78,8	4 ml
BA E-1906	STANDARD F	schwarz	50	262,5	4 ml
BA E-1951	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben!		4 ml
BA E-1952	CONTROL 2	dunkelrot			4 ml

Umrechnung: $5\text{-HIAA (mg/l)} \times 5,25 = 5\text{-HIAA } (\mu\text{mol/l})$

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

BA E-1937 **METHYL-BUFF** **Methylation Buffer** - Gebrauchsfertig

Inhalt: Methanol und Dimethylformamid
 Volumen: 1 x 11 ml/Fläschchen, Deckel braun

Mögliche Gefahren:



H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.

H370 Schädigt die Organe.

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

H301 + H311 + H331 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.

BA E-0041**DILUENT****Diluent** – Gebrauchsfertig

Inhalt: Saurer Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel
 Volumen: 1 x 22 ml/Fläschchen, Deckel weiß

BA E-1913**ASSAY-BUFF****Assay Buffer** – Gebrauchsfertig

Inhalt: TRIS-Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel
 Volumen: 2 x 55 ml/Fläschchen, Deckel dunkelgrün

BA E-1939**METHYL-REAG****Methylation Reagent** – Gebrauchsfertig

Inhalt: Methylierungsreagenz in Diethylether
 Volumen: 1 x 2,25 ml, Deckel weiß

Mögliche
 Gefahren:



H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken..

H370 Schädigt die Organe.

H330 Lebensgefahr bei Einatmen.

H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

H350 Kann Krebs erzeugen.

4. Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte variable Präzisionspipetten zum Pipettieren von 20 - 300 µl; 1 ml
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 - 650 nm-Filter
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Abzug
- Vortex-Mischer
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

5. Probenmaterial und Lagerung

Es kann Spontanurin oder 24 Stunden-Sammelurin verwendet werden (im Sammelbehälter werden zur Stabilisierung des Sammelurins 10 - 15 ml 6 M HCl vorgelegt).

Wird 24 Stunden Sammelurin verwendet, ist es notwendig, das Volumen zu bestimmen und für die spätere Auswertung der Ergebnisse zu notieren. Ist der Säuregehalt des 24 h-Sammelurins zu hoch, wird die 5-HIAA nicht ausreichend methyliert.

Lagerung: für längere Zeit (bis zu 6 Monate) 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.

Die Reaktion des Antiserums, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Je höher die Temperatur, je höher wird die Absorption sein. Die Absorption ist außerdem abhängig von der Inkubationszeit. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassay ist zwischen 20 – 25°C. Es wird empfohlen, dies mit einem Thermometer zu überprüfen.



Liegt die gemessene Absorption außerhalb des Messbereichs, so muss diese innerhalb von 10 Minuten bei 405 nm gemessen werden.

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer


20 ml **WASH-CONC 50X** mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 °C

6.2 Vorverdünnung der Standards, Kontrollen und Proben

1. Jeweils 50 µl Standards, Kontrollen und Urinproben in die entsprechenden Kavitäten der Reaktionsplatte pipettieren.
2. Jeweils 200 µl DILUENT in alle Kavitäten geben.
3. 1 Min bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (approx. 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 REAC-TUBES pipettieren. <i>Die nachfolgenden Schritte 2-5 müssen in einem belüfteten Abzug durchgeführt werden!</i>
2. Jeweils 100 µl METHYL-BUFF in alle REAC-TUBES pipettieren.
3. Jeweils 20 µl METHYL-REAG in alle REAC-TUBES geben und die REAC-TUBES unmittelbar nach Zugabe des METHYL-REAG mischen.
4. Die REAC-TUBES abdecken und 20 Min bei RT (20 – 25 °C) inkubieren.
5. Jeweils 1000 µl ASSAY-BUFF in alle REAC-TUBES 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 Kavitäten der SER 5-HIAA pipettieren.
2. Jeweils 50 µl 5-HIAA-AS in alle Kavitäten pipettieren.
3. Platte mit FOIL abdecken und 1 Stunde bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4. FOIL entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 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. Platte mit FOIL abdecken und 1 Stunde bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
7. FOIL entfernen und den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 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 Kavitäten pipettieren und für 20 - 30 Minuten bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden!
9. 100 µl STOP-SOLN in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
10. Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm (falls vorhanden gegen eine Referenzwellenlänge von 620 - 650 nm) innerhalb von 10 Minuten messen.

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	5-HIAA
	0,17 – 50 mg/l

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentrationen der unbekannt Proben ermittelt werden können, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Absorptionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) erstellt.

Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: Spline, 4- Parameter, Akima) verwendet.

Urinproben und Kontrollen

Die Konzentrationen der **Urinproben** und **Kontrollen** können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Die Tagesmenge 5-HIAA, die innerhalb von 24 Stunden im Urin ausgeschieden wird, errechnet sich wie folgt:

$$\text{mg/24 Stunden} = \text{mg/l} \times \text{l/24 Stunden}$$

Umrechnung

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

Erwarteter Referenzbereich

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich ermittelt.

In einer Studie wurden Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergab sich mit dem 5-HIAA ELISA folgender Wert:

Erwarteter Referenzbereich	5-HIAA
	< 15 mg/Tag

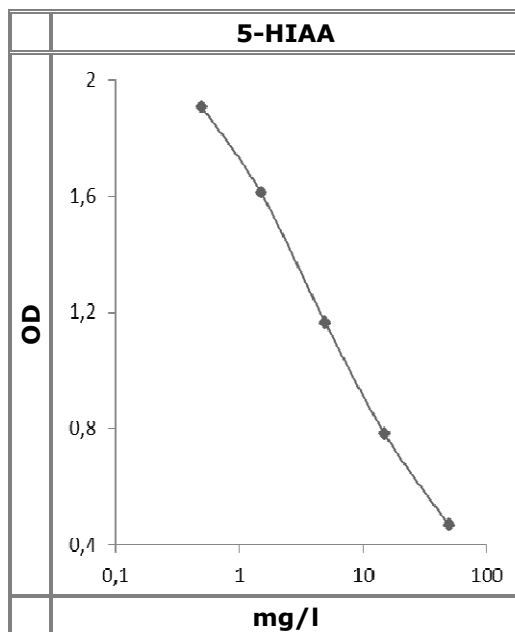
7.1 Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie die Kitkontrolle und/oder andere kommerzielle Kontrollproben im physiologischen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Die Kontrollproben müssen innerhalb der angegebenen Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

7.2 Typische Standardkurve



Beispiel: bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8. Testcharakteristika

Analytische Sensitivität (Limit of Detection)	5-HIAA
	0,17 mg/l

Analytische Spezifität (Kreuzreaktivität)	Substanz	Kreuzreaktivität (%)
		5-HIAA
	5-HIAA	100
	Serotonin	5,5
	5-Hydroxy-DL-Tryptophan	1,8
	Tryptamin	< 0,1
	Melatonin	< 0,1
	5-Hydroxytryptamin	< 0,1
	Vanillic mandelic acid	< 0,1
	Homovanillic Acid	< 0,1

Präzision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
Probe	Bereich (mg/l)	CV (%)	Probe	Bereich (mg/l)	CV (%)
1 n = 40	1,7 ± 0,2	14,1	1 n = 9	3,1 ± 0,3	8,6
2 n = 38	6,6 ± 0,6	8,6	2 n = 9	7,3 ± 0,8	10,8
3 n = 40	18,4 ± 1,9	10,3	3 n = 9	19 ± 2,2	11,4


Linearität		Bereich	Serielle Verdünnung bis	Bereich (%)
	5-HIAA	2,4 - 24,3 mg/l	1:10	98 - 112

Wiederfindung		Mittelwert (%)	Bereich (%)	% Wiederfindung nach Aufstockung
	5-HIAA	101	93 - 111	







Methodenvergleich zur HPLC			
	5-HIAA	HPLC = 0,9 ELISA + 0,2	r = 0,99; n = 47

9. Referenzen/Literatur

- (1) Beer et al. Acupuncture for Hot Flashes in Patients With Prostate Cancer Patients. *Urology*, 76(5):1182-1188 (2010)
- (2) Korse et al. Chromogranin A as an Alternative to 5-Hydroxyindoleacetic Acid in the Evaluation of Symptoms during Treatment of Patients with Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology*, 89:296-301 (2008)
- (3) van Tuyl et al. Detection of small-bowel neuroendocrine tumors by video capsule endoscopy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 64 (1):66-72 (2006)

 **Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anforderung von Ihrem Anbieter gerne zu Verfügung gestellt.**

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer	RUO	Nur für Forschungszwecke