



## Instructions for Use

# Chromogranin A ELISA

IVD



REF EIA-4937

 96



**DRG** 

DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:

**DRG** 

DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTRODUCTION.....	2
2	PROCEDURAL CAUTIONS, GUIDELINES, WARNINGS AND LIMITATIONS.....	2
3	STORAGE AND STABILITY .....	3
4	MATERIALS.....	4
5	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE.....	5
6	TEST PROCEDURE.....	5
7	CALCULATION OF RESULTS.....	6
8	ASSAY CHARACTERISTICS .....	7
1	EINLEITUNG.....	8
2	VERFAHRENSHINWEISE, RICHTLINIEN, WARNUNGEN UND ANWENDUNGSGRENZEN.....	8
3	LAGERUNG UND HALTBARKEIT .....	9
4	MATERIALEN .....	10
5	PROBENMATERIAL UND LAGERUNG .....	11
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	11
7	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE .....	12
8	TESTCHARAKTERISTIKA.....	13
1	INTRODUZIONE.....	14
2	PRECAUZIONI PROCEDURALI, LINEE GUIDA, AVVERTENZE E LIMITAZIONI .....	14
3	CONSERVAZIONE E STABILITÀ.....	15
4	MATERIALI .....	16
5	RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.....	17
6	PROCEDURA DEL TEST .....	17
7	CALCOLO DEI RISULTATI.....	18
8	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	19
9	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA PUBBLICAZIONI.....	20
	SYMBOLS USED.....	21

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of human Chromogranin A in serum and plasma.

The quantitative determination of Chromogranin A (CgA) follows the basic principles of the enzyme immunoassay.

First, the Chromogranin A in samples, controls and standards binds to CgA-specific antibodies fixed to a 96 wells microtiter plate. After incubation and following washing steps, a sandwich is formed by adding CgA antibodies conjugated to horseradish peroxidase. After incubation the wells are washed thoroughly and the complex bound to the solid phase is detected by using TMB as a substrate. The reaction is monitored at 450 nm.

By means of a standard curve the CgA concentrations in the samples are determined.

### 1.2 Clinical application

Chromogranin A or parathyroid secretory protein 1 (gene name CHGA) is a member of the chromogranin/secretogranin (granins) family of neuroendocrine secretory proteins, i.e. it is located in secretory vesicles of neurons and endocrine cells. Examples of cells producing Chromogranin A are chromaffin cells of the adrenal medulla, enterochromaffin-like cells and beta cells of the pancreas.

Chromogranin A (CgA) is the precursor to several functional peptides including

vasostatin, pancreastatin, catestatin and parastatin. These peptides negatively modulate the neuroendocrine function of the releasing cell (autocrine) or nearby cells (paracrine). Other peptides derived from chromogranin A with uncertain function include chromostatin, WE-14 and GE-25.

CgA has become the most important circulating tumour marker for different kinds of neuroendocrine tumors. CgA levels are increased in carcinoid tumors, neuroblastoma, pheochromocytoma, and gastro-entero-pancreatic tumors such as gastrinoma, glucagonoma, insulinoma. An increase of CgA levels in patients with prostate carcinoma is a hint for an unfavourable outcome of the disease.

In addition Chromogranin A-levels show a high correlation to the tumor mass and are therefore widely used to monitor the outcome of therapies.

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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
17. 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.
18. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is available upon request.
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. 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.
21. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of 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**

#### **Serum/Plasma**

Samples containing precipitates or fibrin strands or which are haemolytic or lipemic might cause inaccurate results.

### **2.2.2 Drug interferences**

There are no known substances (drugs) which ingestion interferes with the measurement of Chromogranin A level in the sample.

### **2.2.3 Measuring range**

Do not extrapolate measured values found higher than the highest standard. Samples with higher concentrations have to be pre-diluted.

### **2.2.4 High-Dose-Hook effect**

This assay will not show any kind of high dose hook effect due to separated incubation steps of the antigen and antibody.

## **3 STORAGE AND STABILITY**

Store the unopened reagents at 2 °C - 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 °C - 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

**WASH-CONC 50x**      **Wash Buffer Concentrate** - Concentrated 50x  
 Content: Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH  
 Volume: 1 x 20 mL/vial, light purple cap

**CONJUGATE**      **Antibody Conjugate** - Ready to use  
 Content: Rabbit anti-chromogranin A antibody, conjugated with peroxidase  
 Volume: 1 x 6 mL/vial, red cap

**SUBSTRATE**      **Substrate** - Ready to use  
 Content: Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide  
 Volume: 1 x 12 mL/vial, brown cap

**STOP-SOLN**      **Stop Solution** - Ready to use  
 Content: 0.25 M sulfuric acid  
 Volume: 1 x 12 mL/vial, light grey cap

Hazards identification:



H290 May be corrosive to metals.  
 H314 Causes severe skin burns and eye damage.

**96**      **Chromogranin A Microtiter Strips** - Ready to use  
 Content: 1 x 96 well (12x8) antibody precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant

**Standards and Controls** - Ready to use

Component	Colour/Cap	Concentration µg/L	Volume/Vial
<b>STANDARD A</b>	white	0	1 mL
<b>STANDARD B</b>	light yellow	30	1 mL
<b>STANDARD C</b>	orange	100	1 mL
<b>STANDARD D</b>	dark blue	350	1 mL
<b>STANDARD E</b>	light grey	700	1 mL
<b>CONTROL 1</b>	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!	1 mL
<b>CONTROL 2</b>	dark red		1 mL

Content: Assay buffer spiked with defined quantity of human Chromogranin A

**ASSAY-BUFF**      **Assay Buffer** - Ready to use  
 Content: Buffer with proteins and non-mercury preservatives  
 Volume: 1 x 50 mL/vial, blue cap

### 4.2 Additional materials and equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes of 25, 50, 100, and 200 µL
- 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)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Vortex mixer

## 5 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

### Serum

Collect blood by venipuncture (Monovette™ or Vacuette™), allow to clot, and separate serum by centrifugation according to manufacturer's instructions at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Haemolytic and lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: for longer period (up to 6 months) at -20 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided.

### Plasma

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing EDTA as anti-coagulant (Monovette™ or Vacuette™) and centrifuged according to manufacturer's instructions at room temperature immediately after collection.

Haemolytic and lipemic samples should not be used for the assay.

Storage: for longer period (up to 6 months) at -20 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided.

## 6 TEST PROCEDURE

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

It is recommended to number the strips of the microwell plate before usage to avoid any mix-up.

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. The absorption values also depend on the incubation times. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20 °C - 25 °C.

### 6.1 Preparation of reagents and samples

#### 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 °C - 8 °C

#### Predilution of samples


Prior to use, the samples have to be diluted **1+8** with **Assay Buffer**, e.g. 25 µL of sample + 200 µL of Assay Buffer.

Samples which have been found off-curve should also be diluted accordingly with **Assay Buffer** and re-assayed.

#### Chromogranin A 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 Chromogranin A ELISA

1. Pipette **50 µL** of the **standards, controls and diluted samples** into the wells of the **Chromogranin A Microtiter Strips** and incubate **1 h** at RT (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
2. 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.
3. Pipette **50 µL** of the **Antibody-Conjugate** into all wells and incubate **1 h** at RT (20 – 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
4. 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 **Substrate** into all wells.
6. Incubate for **25 ± 5 min** at RT (20 °C - 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).  
 **Avoid exposure to direct sunlight!**
7. Add **100 µL** of the **Stop Solution** to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
8. **Read** the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microtiter plate reader set to **450 nm** (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

## 7 CALCULATION OF RESULTS

Measuring range	Serum	12.5 – 700 µg/L
	EDTA-Plasma	8 – 700 µg/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).

### Samples and controls

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

Samples found off-curve should be diluted with **Assay Buffer** and re-assayed.

### Expected reference values

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

Expected reference values	Serum/EDTA-Plasma	< 100 µg/L
---------------------------	-------------------	------------

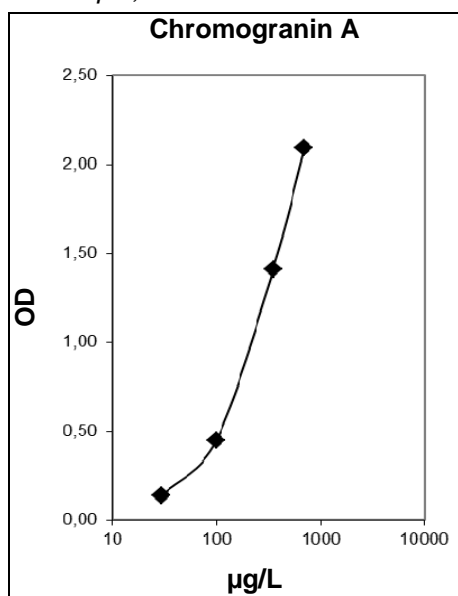
### 7.1 Quality control

It is recommended to use control samples according to 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 listed in the QC-Report.

### 7.2 Typical standard curve



*Example, do not use for calculation!*



## 8 ASSAY CHARACTERISTICS

<b>Analytical Sensitivity</b>	Serum	EDTA-Plasma
<b>Limit of Detection (LOD)</b>	5 µg/L	5 µg/L
<b>Limit of Quantification (LOQ)</b>	12.5 µg/L	8 µg/L

<b>Precision – Intra Assay Variation</b>					
Serum, n = 15			EDTA-Plasma, n = 15		
Sample	Mean ± SD (µg/L)	CV (%)	Sample	Mean ± SD (µg/L)	CV (%)
1	32 ± 2	6	1	26 ± 4	16
2	66 ± 2	3	2	58 ± 5	9
3	151 ± 7	4	3	124 ± 5	4
4	403 ± 33	8	4	356 ± 20	6
5	688 ± 60	9	5	640 ± 31	5

<b>Precision – Inter Assay Variation</b>					
Serum, n = 6			EDTA-Plasma, n = 6		
Sample	Mean ± SD (µg/L)	CV (%)	Sample	Mean ± SD (µg/L)	CV (%)
1	30 ± 1	3	1	27 ± 3	11
2	64 ± 4	6	2	58 ± 2	4
3	144 ± 10	7	3	125 ± 4	3
4	387 ± 22	6	4	366 ± 11	3

<b>Recovery</b>		Range (µg/L)	Range (%)	Mean (%)
	Serum	30 - 405	92 - 116	106
	EDTA-Plasma	22 - 372	92 - 106	94

<b>Linearity</b>		Serial dilution up to	Range (%)	Mean (%)
	Serum	1:1024	99 - 118	113
	EDTA-Plasma	1:1024	86 - 117	106

<b>High-dose hook effect</b>	Despite the fact that a high dose hook effect is theoretically eliminated, we tested samples with concentrations higher than 200,000 µg/L Chromogranin A. A high dose hook effect was not detected.
------------------------------	---

<b>Method comparison versus Kryptor CgA II</b>	Kryptor = 1.14 x DRG ELISA + 3.13; $r^2 = 0.94$ ; n = 82
--	--



## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanem Chromogranin A in Serum und Plasma.

Die Bestimmung des Chromogranin A (CgA) folgt den grundlegenden Prinzipien eines Enzymimmunoassay und basiert auf dem Mikrotiterplattenformat.

Das CgA in Proben, Kontrollen und Standards bindet in einem ersten Inkubationsschritt an CgA-spezifische Antikörper, die an die Festphase der Mikrotiterplatte gebunden sind. Nach der Inkubation und dem Waschschrift werden Meerrettichperoxidase-konjugierte CgA-Antikörper dazugegeben und es bildet sich ein „Sandwich“. Nach dieser Inkubation werden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gründlich gewaschen und der entstandene Komplex wird schließlich durch Zugabe eines Substrates (TMB) nachgewiesen. Die optische Dichte wird bei 450 nm gemessen. Mit Hilfe einer Standardkurve wird die Konzentration des CgA in den Proben ermittelt.

### 1.2 Klinische Anwendung

Chromogranin A oder Parathyroidales Sekretorisches Protein 1 (mit dem Gennamen CHGA) gehört zur Gruppe der Chromogranine/Sekretogranine innerhalb der Familie der neuroendokrinen sekretorischen Proteine, d.h. es befindet sich in sekretorischen Vesikeln der Neuronen und endokrinen Zellen. Beispiele von Zellen, die Chromogranin A produzieren, wären die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, sowie die enterochromaffin-ähnlichen Zellen und Betazellen der Bauchspeicheldrüse.

Chromogranin A (CgA) dient als Vorstufe für mehrere funktionale Peptide wie z.B. Vasostatin, Pankreastatin, Catestatin und Parastatin. Diese Peptide üben ein negatives Feedback auf die sekretierende Zelle selbst (autokrine Funktionsweise) oder auf die benachbarten Zellen (parakrin) aus. Die Funktionsweisen von anderen Peptiden, die ebenfalls aus Chromogranin A gebildet werden, wie z.B. das Chromostatin, WE-14 oder GE-25, sind noch völlig unbekannt.

Heutzutage ist das CgA für bestimmte neuroendokrine Tumore der bedeutendste, zirkulierende Tumormarker. CgA-Spiegel sind erhöht bei carcinoiden Tumoren, Neuroblastoma, Pheochromocytom und gastro-entero-pankreatischen Tumoren wie Gastrinoma, Glukagonoma, Insulinoma.

Eine Erhöhung der CgA-Werte beim Prostatakarzinom kann ein Hinweis für einen ungünstigen Verlauf der Krankheit sein.

Außerdem weisen CgA-Spiegel eine hohe Korrelation zur Tumormasse auf und werden deshalb sehr häufig zur Kontrolle des Therapieverlaufs herangezogen.

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 aber gründlich 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
17. 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.
18. Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist Anfrage erhältlich.
19. Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
20. 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.
21. 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

#### Serum/Plasma

Proben, welche ein Präzipitat oder Fibrinfäden enthalten, die hämolytisch oder lipämisch sind, können zu ungenauen Ergebnissen führen.

### 2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind keine Stoffe (Medikamente) bekannt, deren Einnahme die Bestimmung des Chromogranin A-Gehaltes in der Probe beeinflussen.

### 2.2.3 Messbereich

Keine Messwerte oberhalb des höchsten Standards extrapolieren. Höhere Proben müssen verdünnt werden.

### 2.2.4 High-Dose-Hook Effekt

Auf Grund der separaten Inkubation des Antikörpers und des Antigens ist kein Hook Effekt möglich.

## 3 LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2 °C - 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 °C - 8 °C gelagert werden.

Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

## 4 MATERIALEN

### 4.1 Reagenzien im Kit

**WASH-CONC 50x**      **Wash Buffer Concentrate** - 50x konzentriert  
 Inhalt: Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH Wert  
 Volumen: 1 x 20 mL/Fläschchen, Deckel helllila

**CONJUGATE**      **Antibody Conjugate** - Gebrauchsfertig  
 Inhalt: Kaninchen Anti-Chromogranin A-Antikörper, konjugiert mit Peroxidase  
 Volumen: 1 x 6 mL/ Fläschchen, Deckel rot

**SUBSTRATE**      **Substrate** - Gebrauchsfertig  
 Inhalt: Chromogenes Substrat mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid  
 Volumen: 1 x 12 mL/ Fläschchen , Deckel braun

**STOP-SOLN**      **Stop Solution** - Gebrauchsfertig  
 Inhalt: 0.25 M Schwefelsäure  
 Volumen: 1 x 12 mL/ Fläschchen, Deckel hellgrau

Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.  
 H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

**96**      **Chromogranin A Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig  
 Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antikörper beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem widerverschließbaren Beutel

#### Standards und Controls - Gebrauchsfertig

Komponente	Deckelfarbe	Konzentration µg/L	Volumen/Fläschchen
<b>STANDARD A</b>	weiß	0	1 mL
<b>STANDARD B</b>	hellgelb	30	1 mL
<b>STANDARD C</b>	orange	100	1 mL
<b>STANDARD D</b>	dunkelblau	350	1 mL
<b>STANDARD E</b>	hellgrau	700	1 mL
<b>CONTROL 1</b>	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.	1 mL
<b>CONTROL 2</b>	dunkelrot		1 mL

Inhalt: Assay Puffer aufgestockt mit einer definierten Menge humanem Chromogranin A

**ASSAY-BUFF**      **Assay Buffer** - Gebrauchsfertig  
 Inhalt: Puffer mit Proteinen und quecksilberfreien Konservierungsmitteln  
 Volumen: 1 x 50 mL/ Fläschchen, Deckel blau

### 4.2 Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Geräte und Reagenzien

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 25, 50, 100 und 200 µL
- 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)
- saugfähige Unterlage
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- Vortex-Mischer

## 5 PROBENMATERIAL UND LAGERUNG

### Serum

Blut durch Venenpunktion entnehmen (Monovette™ oder Vacuette™), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation (nach Angabe des Herstellers) abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Hämolytische und lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C; Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

### Plasma

Das durch Venenpunktion entnommene Vollblut in einem für EDTA-Plasma vorgesehenen Blutentnahmeröhrchen (Monovette™ oder Vacuette™) sammeln und das Plasma direkt durch Zentrifugation (nach Angaben des Herstellers) von den übrigen Blutbestandteilen trennen.

Hämolytische und lipämische Proben sollten nicht zur Analytik verwendet werden.

Lagerung: für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C; Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen. Um eventuelle Verwechslungen der Mikrotiterstreifen zu vermeiden, wird empfohlen, diese vor Verwendung zu nummerieren.

Die Reaktion des Antiserums, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Die optimale Temperatur für die Durchführung des Enzymimmunoassay ist zwischen 20 °C - 25 °C. Es wird empfohlen, dies mit einem Thermometer zu überprüfen.

### 6.1 Vorbereitung der Reagenzien und Proben

#### 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 °C - 8 °C

#### Probenvorverdünnung

Die Proben werden vor ihrer Verwendung im ELISA mit **ASSAY-BUFF 1+8** verdünnt.


(z.B. 25 µL Probe + 200 µL **ASSAY-BUFF**).

Proben, die oberhalb des Standardmessbereiches gefunden werden, müssen ebenfalls mit **ASSAY-BUFF** entsprechend verdünnt und nochmals bestimmt werden.

### Chromogranin A Microtiter Strips

Vereinzelt können 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 Chromogranin A ELISA

1. Jeweils **50 µL Standards, Kontrollen und vorverdünnte Proben** in die entsprechenden Kavitäten der **Mikrotiterplatte** pipettieren und **1 Stunde** bei RT (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
  2. 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.
  3. Jeweils **50 µL CONJUGATE** in alle Kavitäten pipettieren und **1 Stunde** bei RT (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
  4. 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. Jeweils **100 µL SUBSTRATE** in alle Kavitäten pipettieren.
  6. Für **25 ± 5 Min** bei RT (20 °C - 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
-  **Direktes Sonnenlicht vermeiden!**
7. **100 µL STOP-SOLN** in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
  8. **Absorption** mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei **450 nm** (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620-650 nm) innerhalb von 10 Minuten **messen**.

## 7 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

<b>Messbereich</b>	Serum	12,5 – 700 µg/L
	EDTA-Plasma	8 – 700 µg/L

Eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntenen Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Extinktionen (Mittelwerte der OD; linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (linearer Maßstab auf der x-Achse) erstellt. Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: spline, 4- parameter, akima) empfohlen.

### Proben und Kontrollen

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

Proben außerhalb des Messbereichs werden mit **ASSAY-BUFF** verdünnt und müssen nochmals bestimmt werden.

### Erwartete Referenzwerte

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

<b>Erwartete Referenzbereiche</b>	Serum/EDTA-Plasma	< 100 µg/L
-----------------------------------	-------------------	------------

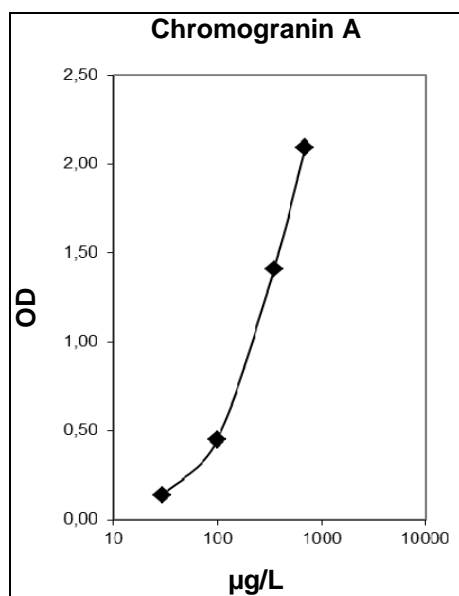
### 7.1 Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie entweder die Kitkontrolle oder andere kommerzielle Kontrollproben mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Diese Kontrollen müssen dabei wie die unbekanntenen Proben behandelt werden. Die Kontrollproben müssen dabei innerhalb der angegebenen Bereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

### 7.2 Typische Standardkurve



*Beispiel: bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



## 8 TESTCHARAKTERISTIKA

<b>Analytische Sensitivität</b>	Serum	EDTA-Plasma
<b>Limit of Detection (LOD)</b>	5 µg/L	5 µg/L
<b>Limit of Quantification (LOQ)</b>	12,5 µg/L	8 µg/L

<b>Präzision – Intra-Assay-Variation</b>					
Serum, n = 15			EDTA-Plasma, n = 15		
Probe	Mittelwert ± SD (µg/L)	CV (%)	Probe	Mittelwert ± SD (µg/L)	CV (%)
1	32 ± 2	6	1	26 ± 4	16
2	66 ± 2	3	2	58 ± 5	9
3	151 ± 7	4	3	124 ± 5	4
4	403 ± 33	8	4	356 ± 20	6
5	688 ± 60	9	5	640 ± 31	5

<b>Präzision – Inter-Assay-Variation</b>					
Serum, n = 6			EDTA-Plasma, n = 6		
Probe	Mittelwert ± SD (µg/L)	CV (%)	Probe	Mittelwert ± SD (µg/L)	CV (%)
1	30 ± 1	3	1	27 ± 3	11
2	64 ± 4	6	2	58 ± 2	4
3	144 ± 10	7	3	125 ± 4	3
4	387 ± 22	6	4	366 ± 11	3

<b>Wiederfindung</b>		Bereich (µg/L)	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	Serum	30 - 405	92 - 116	106
	EDTA-Plasma	22 - 372	92 - 106	94

<b>Linearität</b>		Serielle Verdünnung bis	Bereich (%)	Mittelwert (%)
	Serum	1:1024	99 - 118	113
	EDTA-Plasma	1:1024	86 - 117	106

<b>High Dose Hook Effekt</b>	Obwohl ein High Dose Hook Effekt theoretisch unmöglich ist, wurden Proben mit Konzentrationen über 200.000 µg/L getestet. Es wurde kein High Dose Hook Effekt festgestellt.
------------------------------	---

<b>Methodenvergleich versus Kryptor CgA II</b>	Kryptor = 1.14 x DRG ELISA + 3.13; $r^2 = 0.94$ ; n = 82
--	--

## 1 INTRODUZIONE

### 1.1 Uso previsto e principio del test

Test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione quantitativa della cromogranina A su siero e plasma.

La determinazione quantitativa della cromogranina A (CgA) è fondata sui principi di base dei dosaggi immunoenzimatici.

Prima la cromogranina A contenuta nei campioni, nei controlli e negli standard si lega agli anticorpi CgA-specifici fissati su una piastra per microtitolazione a 96 pozzetti. Dopo l'incubazione e i successivi lavaggi, viene formato un sandwich tramite l'aggiunta degli anticorpi CgA coniugati con perossidasi di rafano. Dopo l'incubazione, i pozzetti vengono lavati accuratamente e viene usato il substrato TMB (tetrametilbenzidina) per rilevare il complesso legato alla fase solida. La reazione viene monitorata a 450 nm.

Le concentrazioni di CgA nei campioni vengono rilevate tramite una curva standard.

### 1.2 Applicazione clinica

La cromogranina A, o proteina secretoria paratiroidea 1 (nome del gene: CHGA), è un membro della famiglia delle cromogranine/secretogranine (granine), ovvero le proteine secretorie dei granuli neuroendocrini che si trovano nelle vescicole secretorie di neuroni e cellule endocrine. La cromogranina A è prodotta, ad esempio, dalle cellule cromaffini nel midollo delle ghiandole surrenali, dalle cellule enterocromaffini e dalle cellule beta-pancreatiche.

La cromogranina A (CgA) è la proteina precorritrice di diversi peptidi funzionali, tra cui la vasostatina, la pancreastatina, la catestatina e la parastatina. Questi peptidi modulano negativamente la funzione neuroendocrina, cioè il rilascio delle cellule (autocrine) o delle cellule circostanti (paracrine). Dalla cromogranina A derivano anche altri peptidi la cui funzione è incerta, come la cromostatina, WE-14 e GE-25.

La CgA è diventata il più importante marcatore circolante per diversi tipi di tumori di origine neuroendocrina. I livelli di CgA aumentano in presenza di tumori carcinoidi, neuroblastomi, feocromocitomi e di tumori gastroenteropancreatici, come il gastrinoma, il glucagonoma, l'insulinoma. Un aumento dei livelli di CgA nei pazienti affetti da carcinoma prostatico può far presagire un esito sfavorevole della malattia.

I livelli di cromogranina A presentano inoltre una forte correlazione con la massa tumorale, pertanto sono ampiamente usati per monitorare il successo delle terapie.

Le decisioni terapeutiche non dovrebbero mai essere prese esclusivamente sulla base dei risultati di laboratorio, neanche se tutti i risultati dei test corrispondono ai punti descritti nel paragrafo "Precauzioni procedurali, linee guida e avvertenze". I risultati di laboratorio sono solo uno degli elementi che compongono il quadro clinico generale del paziente.

Solo nei casi in cui i risultati di laboratorio siano ragionevolmente concordanti con il quadro clinico generale del paziente, è possibile farvi riferimento per prendere decisioni terapeutiche.

Il risultato del test, di per sé, non deve mai essere l'unico fattore determinante per una decisione terapeutica.

## 2 PRECAUZIONI PROCEDURALI, LINEE GUIDA, AVVERTENZE E LIMITAZIONI

### 2.1 Precauzioni procedurali, linee guida e avvertenze

1. Il kit è destinato all'uso esclusivamente professionale. Gli utenti devono avere una perfetta conoscenza del protocollo per l'uso corretto del kit. Solo le istruzioni per l'esecuzione del test fornite con il kit sono valide e devono essere rispettate. Per ottenere prestazioni affidabili, è indispensabile attenersi scrupolosamente alle istruzioni fornite.
2. Il test è stato validato con un tipo di campione specifico, come dichiarato nel paragrafo *Uso previsto* (vedere il capitolo 1). Il produttore declina qualsiasi responsabilità in caso di uso non esplicitamente approvato del kit, di cui l'utente si assumerà i rischi.
3. I reagenti del kit che contengono siero o plasma umano sono stati analizzati per HIV I/II, HBsAg e HCV in conformità alle procedure approvate e sono risultati negativi. Tutti i reagenti devono essere tuttavia considerati un potenziale rischio biologico in fase di uso e smaltimento.
4. Attenersi ai principi di Buona Pratica di Laboratorio (BPL).
5. Al fine di ridurre l'esposizione a sostanze potenzialmente nocive, all'occorrenza indossare un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione.
6. Portare tutti i reagenti del kit e i campioni a temperatura ambiente e miscelare con cura prima dell'uso. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente i reagenti e i campioni.
7. Per le diluizioni e le ricostituzioni usare acqua deionizzata, distillata o ultrapura.
8. La micropiastra contiene delle strisce staccabili. I pozzetti inutilizzati devono essere conservati tra 2 °C e 8 °C nel sacchetto di alluminio sigillato con dentro l'essiccate e devono essere usati entro i tempi indicati.
9. Si raccomanda vivamente di eseguire una doppia misurazione del campione per individuare eventuali errori di pipettamento.
10. Una volta iniziato, il test deve essere completato passo dopo passo senza interruzioni. Assicurarsi che i reagenti, i materiali e i dispositivi necessari siano pronti nei tempi previsti.

11. Il tempo di incubazione può sicuramente influenzare i risultati. È necessario procedere rispettando l'ordine dei pozzetti e con gli stessi intervalli di tempo.
12. Per evitare la contaminazione crociata dei reagenti, cambiare il puntale di pipettamento prima di dispensare un nuovo reagente, campione, standard o controllo.
13. Ad ogni esecuzione deve corrispondere una curva standard.
14. Ogni esecuzione deve includere i controlli, che devono rientrare nei limiti di confidenza fissati. I limiti di confidenza sono indicati nel Report QC.
15. Non mescolare componenti del kit con numeri di lotti diversi per lo stesso test e non usare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sulle etichette dei kit.
16. Evitare il contatto con la soluzione di arresto contenente 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Può causare irritazioni cutanee e ustioni. In caso di contatto con gli occhi o la pelle, lavare immediatamente con acqua.
17. Il substrato TMB ha un effetto irritante sulla pelle e sulle mucose. In caso di contatto, lavare gli occhi con abbondante acqua e lavare la pelle con sapone e abbondante acqua. Lavare gli oggetti contaminati prima di usarli di nuovo.
18. Per informazioni sulle sostanze pericolose contenute nel kit, fare riferimento alla scheda dei dati di sicurezza (SDS). La scheda SDS di questo prodotto è disponibile su richiesta.
19. I valori di riferimento riportati nelle istruzioni per l'uso di questo test sono puramente indicative. Si raccomanda ad ogni laboratorio di definire i propri intervalli di riferimento.
20. I risultati ottenuti con questo kit di analisi non devono costituire l'unico fattore determinante per le decisioni terapeutiche, ma devono essere corroborati da altri test diagnostici e dalle osservazioni cliniche.
21. I reagenti del kit devono essere considerati rifiuti pericolosi e smaltiti in conformità alla normativa nazionale.

## 2.2 Limitazioni

Una manipolazione inadeguata dei campioni o eventuali modifiche apportate al test possono influenzare i risultati.

### 2.2.1 Sostanze interferenti

#### Siero/plasma

I campioni che contengono dei precipitati o dei filamenti di fibrina o che hanno un aspetto emolitico o lipemico possono generare risultati imprecisi.

### 2.2.2 Interferenze dei farmaci

Non sono note sostanze (farmaci) la cui ingestione interferisca con la misurazione del livello di cromogranina A nel campione.

### 2.2.3 Intervallo di misurazione

Non estrapolare i valori misurati che risultano più alti dello standard massimo. I campioni con concentrazioni più elevate devono essere pre-diluiti.

### 2.2.4 Effetto gancio a dose elevata

Questo test non può rilevare alcun tipo di effetto gancio a dose elevata, in quanto l'incubazione dell'antigene e dell'anticorpo avviene in passaggi separati.

## 3 CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare i reagenti in confezione integra a 2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza.

Non usare i componenti oltre la data di scadenza indicata sulle etichette dei kit.


Dopo l'apertura, i reagenti sono stabili per 1 mese se conservati a 2 °C - 8 °C.

Dopo l'apertura del sacchetto richiudibile, fare attenzione a richiuderlo ermeticamente con l'essiccante all'interno.



## 4 MATERIALI

### 4.1 Contenuto del kit

	<b>WASH-CONC 50x</b>	<b>Tampone di lavaggio concentrato</b> - Concentrato 50x
Contenuto	Tampone con un detergente non ionico e pH fisiologico	
Volume	1 x 20 mL/fiala, tappo viola chiaro	
	<b>CONJUGATE</b>	<b>Coniugato di anticorpi</b> - Pronto per l'uso
Contenuto	Anticorpo anti-cromogranina A di coniglio, coniugato con perossidasi	
Volume	1 x 6 mL/fiala, tappo rosso	
	<b>SUBSTRATE</b>	<b>Substrato</b> - Pronto per l'uso
Contenuto	Substrato cromogenico contenente tetrametilbenzidina, tampone substrato e perossido di idrogeno	
Volume	1 x 12 mL/fiala, tappo marrone	
	<b>STOP-SOLN</b>	<b>Soluzione di arresto</b> - Pronta per l'uso
Contenuto	0,25 M acido solforico	
Volume	1 x 12 mL/fiala, tappo verde chiaro	
Indicazioni di pericolo		H290 Può essere corrosivo per i metalli. H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
	<b>96</b>	<b>Strisce di cromogranina A per microtitolazione</b> - Pronte per l'uso
Contenuto	1 micropiastra con 96 pozzetti (12x8) pre-rivestiti con anticorpi in un sacchetto richiudibile con essiccante	

### Standard e Controlli - Pronti per l'uso

Componente	Colore/Tappo	Concentrazione µg/L	Volume/ Fiala
<b>STANDARD A</b>	bianco	0	1 mL
<b>STANDARD B</b>	giallo chiaro	30	1 mL
<b>STANDARD C</b>	arancione	100	1 mL
<b>STANDARD D</b>	blu scuro	350	1 mL
<b>STANDARD E</b>	grigio chiaro	700	1 mL
<b>CONTROL 1</b>	verde chiaro	Per conoscere il valore atteso e l'intervallo di accettabilità, fare riferimento al Report QC.	1 mL
<b>CONTROL 2</b>	rosso scuro		1 mL
Contenuto	Tampone di analisi arricchito con la quantità definita di cromogranina A umana		
	<b>ASSAY-BUFF</b>	<b>Tampone di analisi</b> - Pronto per l'uso	
Contenuto	Tampone con proteine e conservanti senza mercurio		
Volume	1 x 50 mL/fiala, tappo azzurro		

### 4.2 Altri materiali e apparecchiature necessari ma non forniti con il kit

- Pipette di precisione calibrate per dispensare volumi di 25, 50, 100 e 200 µL
- Lavatore per micropiastre (manuale, semiautomatico o automatico)
- Lettore di micropiastre ELISA per letture dell'assorbanza a 450 nm e possibilmente a 620 - 650 nm
- Agitatore per micropiastre (ampiezza di rotazione 3 mm; circa 600 rpm)
- Materiale assorbente (carta)
- Acqua (deionizzata, distillata o ultrapura)
- Miscelatore vortex

## 5 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

### Siero

Prelevare il sangue per venopuntura (Monovette™ o Vacuette™), lasciare coagulare e separare il siero tramite centrifugazione a temperatura ambiente, seguendo le istruzioni del produttore. Prima di centrifugare, attendere che la coagulazione sia completa. Il tempo di coagulazione è più lungo per i pazienti che assumono anticoagulanti. Per questo test non devono essere usati campioni emolitici e lipemici.

Conservazione: per periodi più lunghi (fino a 6 mesi), conservare a -20 °C. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente.

### Plasma

Il sangue intero deve essere raccolto in provette per centrifuga contenenti l'anticoagulante EDTA (Monovette™ o Vacuette™) e quindi centrifugato a temperatura ambiente subito dopo la raccolta, seguendo le istruzioni del produttore. Per questo test non devono essere usati campioni emolitici e lipemici.

Conservazione: per periodi più lunghi (fino a 6 mesi), conservare a -20 °C. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente.

## 6 PROCEDURA DEL TEST

Prima dell'uso, attendere che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente e miscelare con cura capovolgendo delicatamente le fiale. È consigliabile eseguire misurazioni doppie.

Prima dell'uso, è consigliabile numerare le strisce della micropiastra per evitare errori di posizionamento.

La temperatura influenza la formazione di legami tra gli antisieri e i coniugati enzimatici e l'attività stessa dell'enzima, pertanto i valori di assorbimento potrebbero variare se non si usa un termostato. Più la temperatura è alta, più i valori di assorbimento sono alti. I valori di assorbimento sono influenzati anche dal tempo di incubazione. Durante l'esecuzione dell'immunosaggio enzimatico, la temperatura ottimale è di 20 °C - 25 °C.

### 6.1 Preparazione di reagenti e campioni

#### Tampone di lavaggio

Diluire 20 mL di tampone di lavaggio concentrato con acqua (deionizzata, distillata o ultrapura) in modo da ottenere un volume finale di 1000 mL.

Conservazione: 1 mese a 2 °C - 8 °C


#### Pre-diluizione dei campioni

Prima dell'uso, i campioni devono essere diluiti in proporzione **1+8** con il **tampone di analisi**, ad esempio 25 µL di campione + 200 µL di tampone di analisi. I campioni che non rientrano nella curva devono essere diluiti conseguentemente con il **tampone di analisi** e sottoposti di nuovo al test.

#### Strisce di cromogranina A per microtitolazione

In rari casi potrebbero formarsi puntini o strisce bianche nei pozzetti: si tratta dei residui del reagente bloccante e stabilizzante, che non alterano la qualità del prodotto.

### 6.2 ELISA Cromogranina A

1. Pipettare **50 µL** di **standard, controlli e campioni diluiti** nei pozzetti delle **strisce di cromogranina A per microtitolazione** e incubare per **1 ora** a **temperatura ambiente** (20 °C - 25 °C) su un **agitatore** (circa 600 rpm).
2. Svotare o aspirare il contenuto dei pozzetti. Lavare la piastra **4 volte** con **300 µL** di **tampone di lavaggio** e quindi **gettare via il contenuto e asciugare** ogni volta la piastra capovolta picchiettandola su un foglio di carta assorbente.
3. Pipettare **50 µL** di **coniugato anticorpale** in tutti i pozzetti e incubare per **1 ora** a **temperatura ambiente** (20 °C - 25 °C) su un **agitatore** (circa 600 rpm).
4. Svotare o aspirare il contenuto dei pozzetti. Lavare la piastra **4 volte** con **300 µL** di **tampone di lavaggio** e quindi **gettare via il contenuto e asciugare** ogni volta la piastra capovolta picchiettandola su un foglio di carta assorbente.
5. Pipettare **100 µL** di **substrato** in tutti i pozzetti.
6. Incubare per **25 ± 5 minuti** a **temperatura ambiente** (20 °C - 25 °C) su un **agitatore** (circa 600 rpm).  
 **Non esporre direttamente alla luce del sole.**
7. Aggiungere **100 µL** di **soluzione di arresto** in ogni pozzetto e agitare la micropiastra per distribuire uniformemente la soluzione.
8. **Leggere** l'assorbanza della soluzione nei pozzetti entro 10 minuti, usando un lettore di micropiastre impostato su **450 nm** (è preferibile una lunghezza d'onda tra 620 nm e 650 nm, se possibile).

## 7 CALCOLO DEI RISULTATI

Intervallo di misurazione	Siero	12,5 - 700 µg/L
	Plasma EDTA	8 - 700 µg/L

La curva standard si ottiene tracciando le letture dell'assorbanza (calcolare l'assorbanza media) degli standard (lineare, asse y) rispetto alle concentrazioni standard corrispondenti (logaritmica, asse x).

Per l'aggiustamento della curva, usare una regressione non lineare (ad esempio interpolazione spline, a 4 parametri, Akima).

### Campioni e controlli

La concentrazione dei **campioni** e dei **controlli** può essere rilevata direttamente dalla curva standard.

I campioni che non rientrano nella curva devono essere diluiti conseguentemente con il **tampone di analisi** e sottoposti di nuovo al test.

### Valori di riferimento attesi

Si raccomanda vivamente che ogni laboratorio definisca i propri valori di riferimento.

Valori di riferimento attesi	Siero/Plasma EDTA	< 100 µg/L
------------------------------	-------------------	------------

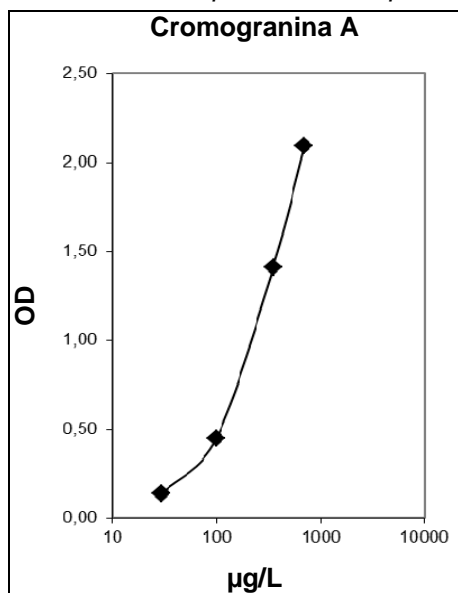
#### 7.1 Controllo di qualità

Si raccomanda di usare i campioni di controllo in conformità alla normativa nazionale. Usare i controlli sia a livelli normali, sia patologici. I controlli inclusi nel kit o gli altri controlli disponibili in commercio devono rientrare nei limiti di confidenza fissati. I limiti di confidenza dei controlli del kit sono indicati nel Report QC.

#### 7.2 Curva standard tipica



*È solo un esempio, non usare per i calcoli*



## 8 CARATTERISTICHE DEL TEST

<b>Sensibilità analitica</b>	Siero	Plasma EDTA
<b>Limite di sensibilità (LOD)</b>	5 µg/L	5 µg/L
<b>Limite di quantificazione (LOQ)</b>	12,5 µg/L	8 µg/L

<b>Precisione - Variazione nel test</b>					
<b>Siero, n = 15</b>			<b>Plasma EDTA, n = 15</b>		
Campione	Media ± DS (µg/L)	CV (%)	Campione	Media ± DS (µg/L)	CV (%)
1	32 ± 2	6	1	26 ± 4	16
2	66 ± 2	3	2	58 ± 5	9
3	151 ± 7	4	3	124 ± 5	4
4	403 ± 33	8	4	356 ± 20	6
5	688 ± 60	9	5	640 ± 31	5

<b>Precisione - Variazione tra test</b>					
<b>Siero, n = 6</b>			<b>Plasma EDTA, n = 6</b>		
Campione	Media ± DS (µg/L)	CV (%)	Campione	Media ± DS (µg/L)	CV (%)
1	30 ± 1	3	1	27 ± 3	11
2	64 ± 4	6	2	58 ± 2	4
3	144 ± 10	7	3	125 ± 4	3
4	387 ± 22	6	4	366 ± 11	3

<b>Recupero</b>		Intervallo (µg/L)	Intervallo (%)	Media (%)
	Siero	30 - 405	92 - 116	106
	Plasma EDTA	22 - 372	92 - 106	94

<b>Linearità</b>		Diluizione seriale fino a	Intervallo (%)	Media (%)
	Siero	1:1024	99 - 118	113
	Plasma EDTA	1:1024	86 - 117	106

<b>Effetto gancio a dose elevata</b>	Pur avendo escluso teoricamente l'effetto gancio a dose elevata, abbiamo analizzato i campioni con concentrazioni di cromogranina A superiori a 200.000 µg/L e non abbiamo rilevato nessun effetto gancio a dose elevata.
--------------------------------------	---

<b>Confronto tra metodi con Kryptor CgA II</b>	Kryptor = 1,14 x DRG ELISA + 3,13; $r^2 = 0,94$ ; n = 82
--	--







**9 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA PUBBLICAZIONI**

1. Deftos, L. J.. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocr Rev* 12(2): 181-187 (1991)
2. Ramage, J. K., A. Ahmed, et al. (2012). "Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumors (NETs)". *Gut* 61(1): 6-32 (2012)
3. Bilek, R., L. Safarik, et al. "Chromogranin A, a member of neuroendocrine secretory as a selective marker for laboratory diagnosis of pheochromocytoma." *Physiol Res* 57(1): 171-179: (2008)
4. Cătălina Poiană et al. The neuroendocrine markers assay and the glycemia profile in patients with neuroendocrine tumors under octreotide therapy: a 2 years study. *Revista Română de Medicină de Laborator*, Vol. 22(3):369-375 (2014)
5. Giovinazzo et al. Chromogranin A and its fragments as regulators of small intestinal neuroendocrine neoplasms proliferation. *PloS One*, 8(11):e81111 (2013)
6. Bieglmayer. Chromogranin A: Ein universeller Marker für neuroendokrine Tumoren. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 3 (4):8-14 (2010)

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

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

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité