



Instructions for Use

Chromogranin A ELISA

IVD



REF EIA-4937

Σ 96



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



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: 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 delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	INTRODUCTION.....	2
2	PROCEDURAL CAUTIONS, GUIDELINES, WARNINGS AND LIMITATIONS.....	2
3	STORAGE AND STABILITY	3
4	MATERIALS.....	4
5	SAMPLE COLLECTION, HANDLING AND STORAGE	5
6	TEST PROCEDURE	5
7	CALCULATION OF RESULTS.....	6
8	CONTROL SAMPLES.....	6
9	ASSAY CHARACTERISTICS.....	7
1	EINLEITUNG.....	8
2	VERFAHRENSHINWEISE, RICHTLINIEN, WARNUNGEN UND ANWENDUNGSGRENZEN	8
3	LAGERUNG UND HALTBARKEIT	10
4	MATERIALEN	10
5	PROBENSAMMLUNG, -BEHANDLUNG UND -LAGERUNG	11
6	TESTDURCHFÜHRUNG	11
7	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	12
8	KONTROLLPROBEN.....	13
9	ASSAYCHARAKTERISTIKA	13
1	INTRODUZIONE	15
2	PRECAUZIONI PROCEDURALI, LINEE GUIDA, AVVERTENZE E RESTRIZIONI.....	15
3	CONSERVAZIONE E STABILITÀ	17
4	MATERIALI	17
5	RACCOLTA, MANIPOLAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	18
6	PROCEDURA DI PROVA	18
7	CALCOLO DEI RISULTATI.....	19
8	CAMPIONI DI CONTROLLO.....	20
9	CARATTERISTICHE DEL SAGGIO.....	20
10	REFERENCES / LITERATURE / REFERENZEN/LITERATUR.....	22
	SYMBOLS USED.....	23

1 INTRODUCTION

1.1 Intended use and principle of the test

Enzyme immunoassay for the **quantitative** determination of Chromogranin A in serum.

The determination of Chromogranin A helps in the detection of neuroendocrine tumors and is used to assess the course of the cancer treatment.

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

First, the Chromogranin A in the 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 resulting in a colour reaction. The reaction is monitored at a wavelength of 450 nm. By means of a standard curve the CgA concentrations in the samples are determined.

Manual processing of the ELISA is recommended. The use of automatic laboratory equipment is the responsibility of the user.

This in-vitro diagnostic is for professional use only.

1.2 Clinical application

Chromogranin A (CgA) is an acid glycoprotein with 439 amino acids that is present in the secretory dense core granules of most neuroendocrine cells [1]. The chromogranin family consists of at least three different water-soluble acidic glycoproteins (CgA, CgB, and secretogranin II, sometimes called Chromogranin C) [1].

Upon stimulation, CgA and other peptide hormones and neuropeptides are released. CgA is also secreted from neuroendocrine-derived tumors [1].

Neuroendocrine tumors (NETs), which originate from neuroendocrine cells, are found widely distributed throughout the body [2]. The most common sites of NET are the lung, stomach, appendix, cecum, duodenum, pancreas, jejunum/ileum, colon and rectum [3]. NET arising from the gastrointestinal tract are collectively known as gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP- NET) and account for approximately 2/3 of incident NET [3]. The annual incidence of NET is estimated as 2 – 5 cases per 100,000 population [2].

CgA is widely expressed throughout the neuroendocrine system and serves as a general biomarker for a wide variety of neuroendocrine tumors [3]. The determination of Chromogranin A helps in the detection of neuroendocrine tumors and is used to assess the course of cancer treatment [3-6].

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

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

2 PROCEDURAL CAUTIONS, GUIDELINES, WARNINGS AND LIMITATIONS

2.1 Procedural cautions, guidelines and warnings

1. This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and must be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. This assay was validated for a certain type of sample as indicated in Intended Use (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
3. The principles of Good Laboratory Practice (GLP) must be followed.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
5. If serious incidents should occur in connection with this product, they should be reported to the manufacturer and the competent national authorities.
6. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
7. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C - 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided. Microtiter strips which are removed from the frame for usage should be marked accordingly to avoid any mix-up.
8. Duplicate determination of sample is highly recommended.
9. Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials, and devices are prepared for use at the appropriate time.

10. Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
11. To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.
12. A standard curve must be established for each run.
13. The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report provided with the kit.
14. Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
16. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Rinse contaminated items before reuse.
17. For information about hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheet (SDS). The Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
18. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.
19. The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
20. In case of any severe damage to the test kit or components, the manufacturer has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components must not be used for a test run. They must be stored properly until the manufacturer decides what to do with them. If it is decided that they are no longer suitable for measurements, they must be disposed of in accordance with national regulations.
21. The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but must be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
22. 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.

2.2 Limitations

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

In about 10 % of the samples used in the method comparison, a discrepancy was detected between the Kryptor CgA II and the ELISA measurements. These were exclusively samples whose CgA concentrations were in the range of 350 to 900 µg/L.

The sequence of the specific antibodies used was checked for possible cross-reactions. Even if no significant cross-reactivities could be detected, it cannot be excluded that in rare individual cases and depending on medication or disease status, influences on the values may occur.

If the Chromogranin A determination is used as part of a patient's follow-up, we therefore recommend the following procedure:

- A patient's sample should always be examined using the same method during the course of his treatment.
- In case of abnormalities during the follow-up, it should be investigated whether changes in medication or lifestyle have taken place.

If you have any further questions, please contact the manufacturer.

2.2.1 Interfering substances

Serum samples containing precipitates or fibrin strands might cause inaccurate results.

Biotin (up to 1200 ng/mL), hemolytic samples (up to 1 mg/mL hemoglobin), icteric samples (up to 50 mg/dL bilirubin) and lipemic samples (up to 1700 mg/dL triglycerides) have no influence on the assay results.

When in doubt, it is recommended that hemolytic, icteric, and lipemic samples not be used in the assay.

2.2.2 Drug interferences

Medications like proton pump inhibitors, selective serotonin reuptake inhibitors, histamine type-2 receptor antagonists and somatostatin analogues can influence CgA level in serum.

2.2.3 High-Dose-Hook effect

No hook effect was observed in this test.

3 STORAGE AND STABILITY

Store kit and reagents at 2 °C - 8 °C until expiration date.

Do not use kit and components beyond the expiry date indicated on the kit labels.

Once opened the reagents are stable for 2 months when stored at 2 °C - 8 °C.

Once the resealable pouch of the ELISA plate has been opened, care should be taken to close it tightly again including the desiccant.

4 MATERIALS

4.1 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, purple cap	
	SUBSTRATE	Substrate – ready to use
Content:	Chromogenic substrate containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 mL/vial, black cap	
	STOP-SOLN	Stop Solution – ready to use
Content:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 mL/vial, grey cap	
	CONJUGATE	Antibody Conjugate – ready to use
Content:	Rabbit anti-chromogranin A antibody, conjugated with peroxidase	
Volume:	1 x 6 mL/vial, red cap	
Description:	Species is rabbit	
	ASSAY-BUFF	Assay Buffer – ready to use
Content:	Buffer with proteins and non-mercury preservatives	
Volume:	1 x 50 mL/vial, blue cap	
Description:	Species of protein in the buffer is bovine	
	W 96	Chromogranin A Microtiter Strips – ready to use
Content:	1 x 96 well (12x8) antibody precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant	
Description:	Species is rabbit	

4.2 Calibration and Controls

Standards and Controls – ready to use

Component	Colour/Cap	Concentration [$\mu\text{g/L}$] CgA	Volume/Vial
STANDARD A	white	0	1 mL
STANDARD B	yellow	30	1 mL
STANDARD C	orange	110	1 mL
STANDARD D	blue	450	1 mL
STANDARD E	grey	900	1 mL
CONTROL 1	green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range.	1 mL
CONTROL 2	red		1 mL

Content: Assay Buffer with a defined quantity of human Chromogranin A and stabilizing protein
 Description: Chromogranin A is derived from human, the stabilizing protein is from bovine origin

4.3 Additional materials required but not provided in the kit

- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Absorbent material (paper towel)

4.4 Additional equipment required but not provided in the kit

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes between 20 – 400 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)
- Vortex mixer

5 SAMPLE COLLECTION, HANDLING AND STORAGE

Serum

Collect blood by venipuncture, allow to clot, and separate serum by centrifugation according to manufacturer's instructions. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

When in doubt, it is recommended that hemolytic, icteric, and lipemic samples not be used in the assay (see 2.2.1).


Storage: Up to 2 days at 2 °C – 8 °C; storage for a longer period (up to 6 months) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

6 TEST PROCEDURE

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

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

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

6.1 Preparation of reagents and further notes

Wash Buffer

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

Storage: 2 months at 2 °C - 8 °C

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 Preparation of samples – Dilution

1. Prior to use, the serum samples have to be diluted **1+20** with **ASSAY-BUFF**, e.g. 20 µL of serum sample + 400 µL of **ASSAY-BUFF**.

Serum samples which have been found off-curve should also be diluted accordingly with **ASSAY-BUFF** and re-assayed.

6.3 Chromogranin A ELISA

1. Pipette **50 µL** of the **standards, controls and diluted samples** into the appropriate 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 times** 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 **CONJUGATE** into all wells and incubate **1 h** at **RT** (20 °C – 25 °C) on a **shaker** (approx. 600 rpm).
4. Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate **4 times** by adding **300 µL** of **Wash Buffer**, **discarding** the content and **blotting dry each time** by tapping the inverted plate on absorbent material.
5. Pipette **100 µL** of the **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-SOLN** to all wells and shake the microtiter plate shortly.
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	Chromogranin A in serum
	2.3 – 900 µg/L

The standard curve, which can be used to determine the concentration of the unknown samples, is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis) using a concentration of 0.001 µg/L for Standard A (this alignment is mandatory because of the logarithmic presentation of the data).

Use a non-linear regression for curve fitting (e.g. 4-parameter, marquardt).

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

Samples found with concentrations higher than the highest standard (Standard E) should be diluted accordingly with **ASSAY-BUFF** and must be re-assayed.

7.1 Expected reference values

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

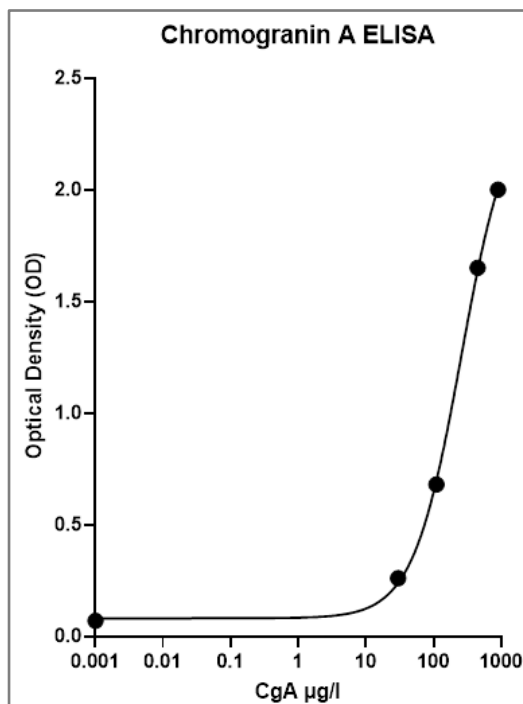
The expected reference values indicated below are based on method comparison studies to B.R.A.H.M.S Kryptor CgA II. The expected reference value was determined in a study by van Treijen, M.J.C., et al [7].

	Chromogranin A in serum
Reference value (ULN)	<100 µg/L
Typical pathological range	Up to 143 500 µg/L

7.2 Typical standard curve



Example: Do not use for calculation!



8 CONTROL SAMPLES

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

9 ASSAY CHARACTERISTICS

9.1 Performance data

Analytical Sensitivity	
Limit of Blank (LOB)	0.9 µg/L
Limit of Detection (LOD)	1.4 µg/L
Limit of Quantification (LOQ)	2.3 µg/L

Precision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
n = 12			n = 10		
Sample	Mean ± SD [µg/L]	CV [%]	Sample	Mean ± SD [µg/L]	CV [%]
1	43.6 ± 1.2	2.8	1	73.0 ± 3.8	5.2
2	73.5 ± 3.0	4.2	2	102 ± 3.5	3.5
3	103 ± 3.4	3.3	3	161 ± 5.7	3.6
4	161 ± 10.1	6.3	4	300 ± 16.0	5.3
5	283 ± 14.6	5.1			
6	502 ± 15.9	3.2			

Lot-to-Lot			
	Sample	mean ± SD [µg/L]	CV [%]
Chromogranin A in serum (n = 3)	1	46.3 ± 2.3	5.1
	2	111 ± 7.2	6.5
	3	479 ± 61.8	12.9

Recovery			
	Range [µg/L]	Mean [%]	Range [%]
Chromogranin A	43.6 – 502	102	100 – 104

Linearity			
	Serial Dilution up to	Mean [%]	Range [%]
Chromogranin A	1:64	92	91 – 96

Method Comparison: B.R.A.H.M.S Kryptor CgA II	CgA ELISA = 1.05 x (Kryptor CgA II) – 15; R ² = 0.97; n = 57

Diagnostic Performance GEP-NET [7]			
Diagnostic Specificity [%]	Diagnostic Sensitivity [%]	Positive Predictive Value (PPV) [%]	Negative Predictive Value (NPV) [%]
83	56	87	49
Positive Likelihood Ratio (LR+)		Negative Likelihood Ratio (LR-)	
3.3		0.53	

9.2 Metrological Traceability

The values assigned to the standards and controls of the Chromogranin A ELISA are traceable to the reference method B.R.A.H.M.S Kryptor CgA II.

Standards and Controls	Uncertainty [%]
	7.5

Chromogranin A ELISA	Expanded Uncertainty [%] k=2*
	16.5

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

1 EINLEITUNG

1.1 Verwendungszweck und Testprinzip

Enzymimmunoassay zur **quantitativen** Bestimmung von Chromogranin A in Serum. Die Bestimmung von Chromogranin A hilft bei der Erkennung neuroendokriner Tumore und wird zur Beurteilung des Verlaufs der Krebsbehandlung eingesetzt. Die Bestimmung des Chromogranin A (CgA) folgt den grundlegenden Prinzipien eines Enzymimmunoassays und basiert auf dem Mikrotiterplattenformat.

Das CgA in den 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 Wells der Mikrotiterplatte gründlich gewaschen und der entstandene Komplex wird schließlich durch Zugabe eines Substrates (TMB) durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Mit Hilfe einer Standardkurve wird die Konzentration des CgA in den Proben ermittelt.

Die manuelle Abarbeitung des ELISAs wird empfohlen. Die Verwendung von automatisierten Laborgeräten liegt in der Verantwortung des Anwenders.

Dieses In-Vitro-Diagnostikum ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

1.2 Klinische Anwendung

Chromogranin A (CgA) ist ein saures Glykoprotein bestehend aus 439 Aminosäuren, das in den sekretorischen Granula mit Dichtekern der meisten neuroendokrinen Zellen vorhanden ist [1]. Die Chromogranin-Familie besteht aus mindestens drei verschiedenen wasserlöslichen sauren Glykoproteinen (CgA, CgB und Secretogranin II, manchmal auch Chromogranin C genannt) [1].

Nach Stimulation werden CgA und andere Peptidhormone und Neuropeptide freigesetzt [1]. CgA wird auch von Tumoren neuroendokrinen Ursprungs sezerniert [1].

Neuroendokrine Tumore (NETs), die von neuroendokrinen Zellen ausgehen, finden sich weit verbreitet im ganzen Körper [2]. Die häufigsten Lokalisationen von NET sind die Lunge, der Magen, Blinddarm und sein Wurmfortsatz, Zwölffingerdarm, die Bauchspeicheldrüse, der Leerdarm/Krummdarm,

Dickdarm und Mastdarm [3]. Vom Gastrointestinaltrakt ausgehende NET werden als gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore (GEP-NET) bezeichnet und machen etwa 2/3 aller neu auftretenden Fälle von NET aus [3]. Die jährliche Inzidenz von NET wird auf 2 – 5 Fälle pro 100.000 Einwohner geschätzt [2].

CgA wird im gesamten neuroendokrinen System weitgehend exprimiert und dient als allgemeiner Biomarker für eine Vielzahl neuroendokriner Tumore [3]. Die Bestimmung von CgA hilft bei der Erkennung von neuroendokrinen Tumoren und wird zur Beurteilung des Verlaufs dieser Krebsbehandlung eingesetzt [3-6].

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

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

2 VERFAHRENSHINWEISE, RICHTLINIEN, WARNUNGEN UND ANWENDUNGSGRENZEN

2.1 Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen

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

8. Proben sollten in Doppelbestimmung gemessen werden.
9. Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
10. Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Wells sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
11. Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
12. Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
13. Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen der Kitkontrollen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
14. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
15. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
16. Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
17. Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe das Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
18. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potenziell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
19. Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
20. Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen sachgerecht gelagert werden, bis der Hersteller entscheidet, wie mit ihnen zu verfahren ist. Sollte entschieden werden, dass sie für Messungen nicht mehr geeignet sind, müssen sie entsprechend den nationalen Richtlinien entsorgt werden.
21. Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden
22. 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.

2.2 Grenzen des Tests

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

Bei etwa 10 % der Proben, die im Methodenvergleich mitgeführt wurden, wurde eine Diskrepanz zwischen der CgA II Kryptor- und der ELISA-Messungen festgestellt. Dabei handelte es sich ausschließlich um Proben, deren CgA-Konzentrationen im Bereich von 350 bis 900 µg/L lagen.

Die Sequenz der verwendeten spezifischen Antikörper wurde auf mögliche Kreuzreaktionen geprüft. Auch wenn keine wesentlichen Kreuzreaktivitäten nachgewiesen werden konnten, ist nicht auszuschließen, dass es in seltenen Einzelfällen und in Abhängigkeit von Medikation oder Krankheitsstatus zu Beeinflussungen der Wertelage kommen kann.

Sollte die Chromograninbestimmung im Rahmen einer Verlaufskontrolle von Patienten eingesetzt werden, empfehlen wir deshalb folgende Vorgehensweise:

- Die Proben eines Patienten sollten im Verlauf seiner Behandlung immer mit der gleichen Methode untersucht werden.
- Bei Auffälligkeiten während der Verlaufskontrolle sollte hinterfragt werden, ob Änderungen der Medikation oder des Lebensstils stattgefunden haben.

Bei weiteren Fragen hierzu, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

2.2.1 Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben

Proben, die ein Präzipitat oder die Fibrinfäden enthalten, können zu ungenauen Ergebnissen führen. Biotin (bis zu 1200 ng/mL), hämolytische Proben (bis zu 1 mg/mL Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 50 mg/dL Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 1700 mg/dL Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse. Es wird im empfohlen im Zweifel hämolytische, ikterische und lipämische Proben nicht im Assay einzusetzen.

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel

Medikamente wie Protonenpumpenhemmer, Serotoninwiederaufnahmehemmer, Histamin Typ-2 Rezeptorantagonisten und Somatostatin-Analoga können die CgA-Konzentration im Serum beeinflussen.

2.2.3 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Assay nicht auf.

3 LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Das Kit muss bei 2 °C – 8 °C bis zum Verfallsdatum gelagert werden.

Das Kit und die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfalldatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 2 Monate stabil, wenn sie bei 2 °C – 8 °C gelagert werden.

Der einmal geöffnete Folienbeutel der ELISA-Platte sollte stets mit Trockenbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4 MATERIALEN

4.1 Reagenzien im Kit

	WASH-CONC 50x	Waschpufferkonzentrat – 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 mL/Fläschchen, Deckel lila	
	SUBSTRATE	Substrat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 mL/Fläschchen, Deckel schwarz	
	STOP-SOLN	Stopplösung – gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 mL/Fläschchen, Deckel grau	
	CONJUGATE	Antiserum Konjugat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Kaninchen Anti-Chromogranin A Antikörper, konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 6 mL/Fläschchen, Deckel rot	
Beschreibung:	Spezies ist Kaninchen	
	ASSAY-BUFF	Assaypuffer – gebrauchsfertig
Inhalt:	Puffer mit Proteinen und quecksilberfreien Konservierungsmitteln	
Volumen:	1 x 50 mL/Fläschchen, Deckel blau	
Beschreibung:	Spezies vom Protein in dem Puffer ist Rind	
	W 96	Chromogranin A Mikrotiterstreifen – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Well (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Beutel	
Beschreibung:	Spezies ist Ziege	

4.2 Kalibratoren und Kontrollen

Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig

Komponente	Deckelfarbe	Konzentration [$\mu\text{g/L}$] CgA	Volumen/ Fläschchen
STANDARD A	weiß	0	1 mL
STANDARD B	gelb	30	1 mL
STANDARD C	orange	110	1 mL
STANDARD D	blau	450	1 mL
STANDARD E	grau	900	1 mL
CONTROL 1	grün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.	1 mL
CONTROL 2	rot		1 mL

Inhalt: Assay-Puffer mit einer definierten Menge an humanem Chromogranin A und Stabilisierungsprotein.

Beschreibung: Das Chromogranin A ist humanen Ursprungs (Spezies Mensch), das Stabilisierungsprotein ist tierischen Ursprungs (Spezies Rind).

4.3 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien

- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

4.4 Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 20 µL – 400 µL
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer mit 450 nm und, wenn möglich, 620 – 650 nm-Filter zur Auswertung von Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplattenschüttler (Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm)
- Vortex-Mischer

5 PROBENSAMMLUNG, -BEHANDLUNG UND -LAGERUNG

Serum

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

Es wird im Zweifel empfohlen, hämolytische, ikterische und lipämische Proben nicht im Assay einzusetzen (siehe 2.2.1).


Lagerung: Bis zu 2 Tage bei 2 °C bis 8 °C; für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

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

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

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

6.1 Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise

Waschpuffer

20 mL **WASH-CONC 50X** mit Wasser auf ein Endvolumen von 1000 mL verdünnen.

Lagerung: 2 Monate bei 2 °C - 8 °C

Chromogranin A Microtiter Strips

Vereinzelte 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 Probenvorbereitung – Verdünnung

1. Die Proben werden vor ihrer Verwendung im ELISA mit **ASSAY-BUFF 1+20** verdünnt, z.B. 20 µL Serum Probe + 400 µL **ASSAY-BUFF**.

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

6.3 Chromogranin A ELISA

1. Jeweils **50 µL Standards, Kontrollen und vorverdünnte Proben** in die entsprechenden Wells der **Chromogranin A Mikrotiterstreifen** **LI 96** pipettieren und **1 h** bei **RT (20 °C - 25 °C)** auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
2. Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells **4-mal** gründlich mit **300 µL Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
3. **50 µL CONJUGATE** in alle Wells pipettieren und **1 h** bei **RT (20 °C - 25 °C)** auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
4. Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells **4-mal** gründlich mit **300 µL Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5. **100 µL SUBSTRATE** in alle Wells 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 Wells pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
8. **Absorption** mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei **450 nm** innerhalb von 10 Min **messen** (falls vorhanden, wird eine Referenzwellenlänge zwischen 620 und 650 nm empfohlen).

7 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messbereich	Chromogranin A in Serum
	2,3 – 900 µg/L

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannt Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standardabsorptionen (Berechnung der mittleren Absorption, linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) mit einer Konzentration von 0,001 µg/L für Standard A (diese Ausrichtung ist aufgrund der logarithmischen Darstellung der Daten erforderlich) erstellt.

Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: 4-parameter, marquardt) verwendet.

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

Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (Standard E) gefunden werden, müssen entsprechend mit Assaypuffer **ASSAY-BUFF** verdünnt und nochmals bestimmt werden.

7.1 Erwartete Referenzbereiche

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

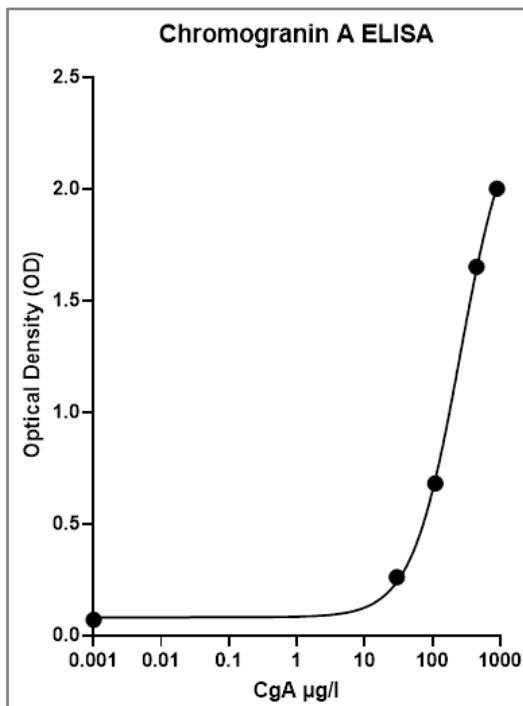
Die unten angegebenen erwarteten Referenzwerte basieren auf einer Methodenvergleichsstudie mit B.R.A.H.M.S Kryptor CgA II. Der erwartete Referenzwert wurde in einer internen Studie von van Treijen, M.J.C., et al. [7] ermittelt.

	Chromogranin A in Serum
Referenzbereich (ULN)	< 100 µg/L
Typischer pathologischer Bereich	Bis zu 143 500 µg/L

7.2

7.3 Typische Standardkurve

Beispiel: Bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8 KONTROLLPROBEN

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

9 ASSAYCHARAKTERISTIKA

9.1 Leistungsdaten

Analytische Sensitivität	
Limit of Blank (LOB)	0,9 µg/L
Limit of Detection (LOD)	1,4 µg/L
Limit of Quantification (LOQ)	2,3 µg/L

Präzision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
n = 12			n = 10		
Probe	Mittelwert ± SD [µg/L]	CV [%]	Probe	Mittelwert ± SD [µg/L]	CV [%]
1	43,6 ± 1,2	2,8	1	73,0 ± 3,8	5,2
2	73,5 ± 3,0	4,2	2	102 ± 3,5	3,5
3	103 ± 3,4	3,3	3	161 ± 5,7	3,6
4	161 ± 10,1	6,3	4	300 ± 16,0	5,3
5	283 ± 14,6	5,1			
6	502 ± 15,9	3,2			

Lot to Lot	Chromogranin A in serum (n = 4)	Probe	mean ± SD [µg/L]	CV [%]
		1	46,3 ± 2,3	5,1
		2	111 ± 7,2	6,5
		3	479 ± 61,8	12,9

Wiederfindung		Bereich [$\mu\text{g/L}$]	Mittelwert [%]	Bereich [%]
	Chromogranin A	43,6 – 502	102	100 – 104

Linearität		Serielle Verdünnung bis	Mittelwert [%]	Bereich [%]
	Chromogranin A	1:64	92	91 – 96

Methodenvergleich: B.R.A.H.M.S Kryptor CgA II	CgA ELISA = 1,05 x (Kryptor CgA II) – 15; $R^2 = 0,97$; n = 57
--	---

Klinische Leistung GEP-NET [7]	Diagnostische Spezifität [%]	Diagnostische Sensitivität [%]	Positiver Prädiktiver Wert (PPV) [%]	Negativer Prädiktiver Wert (NPV) [%]
	83	56	87	49
	Positives Likelihood Ratio (LR+)		Negatives Likelihood Ratio (LR-)	
	3,3		0,53	

9.2 Metrologische Rückführbarkeit

Die zugeordneten Werte der Standards und Kontrollen vom Chromogranin A ELISA sind auf die B.R.A.H.M.S Kryptor CgA II Methode rückführbar.

Standards und Kontrollen	Unsicherheit [%]
	7,5

Chromogranin A ELISA	Erweiterte Unsicherheit [%] $k = 2^*$
	16,5

* Damit wird ein Intervall um das gemessene Ergebnis definiert, das den wahren Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % einschließt.

1 INTRODUZIONE

1.1 Uso previsto e principi del test

Saggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa della Cromogranina A nel siero. La determinazione della Cromogranina A aiuta nella rilevazione dei tumori neuroendocrini e viene utilizzata per valutare il decorso del trattamento oncologico.

La determinazione quantitativa della Cromogranina A (CgA) segue i principi di base del saggio immunoenzimatico.

In primo luogo, la Cromogranina A presente 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 le successive fasi di lavaggio, si forma un sandwich aggiungendo anticorpi CgA coniugati alla perossidasi di rafano. Dopo l'incubazione i pozzetti vengono lavati accuratamente e il complesso legato alla fase solida viene rilevato utilizzando TMB come substrato, con conseguente reazione cromatica. La reazione viene monitorata a una lunghezza d'onda di 450 nm.

Per mezzo di una curva standard, vengono determinate le concentrazioni di CgA nei campioni. Si raccomanda il processamento manuale di ELISA. L'utilizzo dell'apparecchiatura di laboratorio automatica rientra nella sfera di responsabilità dell'utilizzatore.

Questa diagnostica *in vitro* è destinata solo all'uso professionale.

1.2 Applicazione clinica

La Cromogranina A (CgA) è una glicoproteina acida con 439 amminoacidi che è presente nei granuli secretori a nucleo denso della maggior parte delle cellule neuroendocrine [1]. La famiglia delle cromogranine è costituita da almeno tre diverse glicoproteine acide idrosolubili (CgA, CgB e secretogranina II, a volte chiamata Cromogranina C) [1].

In seguito alla stimolazione, vengono rilasciati CgA, altri ormoni peptidici e neuropeptidi. La CgA viene secreta anche da tumori di origine neuroendocrina [1].

I tumori neuroendocrini (NET), che hanno origine dalle cellule neuroendocrine, si riscontrano ampiamente distribuiti in tutto l'organismo [2]. I siti più comuni dei NET sono il polmone, lo stomaco, l'appendice, l'intestino cieco, il duodeno, il pancreas, il digiuno/l'ileo, il colon e il retto [3]. I NET derivanti dal tratto gastrointestinale sono noti collettivamente come tumori neuroendocrini gastro-entero-pancreatici (GEP-NET) e rappresentano circa i 2/3 dei NET incidenti [3]. L'incidenza annuale dei NET è stimata in 2 – 5 casi per 100.000 abitanti [2].

La CgA è ampiamente espressa in tutto il sistema neuroendocrino e funge da biomarcatore generale per un'ampia varietà di tumori neuroendocrini [3]. La determinazione della Cromogranina A aiuta nella rilevazione dei tumori neuroendocrini e viene utilizzata per valutare il decorso del trattamento oncologico [3-6].

Le conseguenze terapeutiche non dovrebbero mai basarsi solo sui risultati di laboratorio, anche se questi risultati sono valutati in conformità con i criteri di qualità del metodo. Qualsiasi risultato di laboratorio è solo una parte del quadro clinico totale del paziente.

Solo nei casi in cui i risultati di laboratorio siano in un accordo accettabile con il quadro clinico complessivo del paziente, tale risultato può essere utilizzato per le conseguenze terapeutiche.

2 PRECAUZIONI PROCEDURALI, LINEE GUIDA, AVVERTENZE E RESTRIZIONI

2.1 Precauzioni procedurali, linee guida e avvertenze

1. Questo kit è destinato esclusivamente all'uso professionale. Per il corretto utilizzo del kit, gli utilizzatori devono avere una conoscenza approfondita di questo protocollo. Solo le istruzioni per il test fornite con il kit sono valide e devono essere utilizzate per eseguire il saggio. Prestazioni affidabili saranno raggiunte solo con il rigoroso e attento rispetto delle istruzioni fornite.
2. Questo saggio è stato convalidato per un determinato tipo di campione come indicato in Uso previsto (cfr. cap. 1). Eventuali usi off-label di questo kit rientrano nella sfera di responsabilità dell'utente e il fabbricante declina qualsiasi responsabilità in merito.
3. Devono essere seguiti i principi di Buona Pratica di Laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
4. Al fine di ridurre l'esposizione a sostanze potenzialmente nocive, indossare camici da laboratorio, guanti protettivi monouso e occhiali protettivi ove necessario.
5. Eventuali incidenti gravi che dovessero verificarsi in relazione a questo prodotto vanno segnalati al fabbricante e alle autorità nazionali competenti.
6. Tutti i reagenti e i campioni del kit devono essere portati a temperatura ambiente e miscelati delicatamente ma accuratamente prima dell'uso. Per scopi di diluizione o ricostituzione, utilizzare acqua deionizzata, distillata o ultrapura. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei reagenti e dei campioni.
7. La micropiastra contiene strisce a strappo. I pozzetti non utilizzati devono essere conservati a 2 – 8 °C nel sacchetto di alluminio sigillato con essiccante e utilizzati nel telaio accluso. Le strisce per microtitolazione rimosse dal telaio per l'uso devono essere adeguatamente contrassegnate in modo da evitare ogni confusione.
8. Si raccomanda vivamente una doppia determinazione del campione.

9. Una volta avviato il test, tutti i passaggi devono essere completati senza interruzioni. Accertarsi che i reagenti, i materiali e i dispositivi richiesti siano pronti per l'uso al momento opportuno.
10. I tempi di incubazione influenzano i risultati. Tutti i pozzetti devono essere gestiti nello stesso ordine e negli stessi intervalli di tempo.
11. Per evitare la contaminazione crociata dei reagenti, utilizzare un nuovo puntale per pipette monouso all'erogazione di ciascun reagente, campione, standard e controllo.
12. È necessario stabilire una curva standard per ogni sessione analitica.
13. I controlli devono essere inclusi in ogni sessione analitica e rientrare nei limiti di confidenza stabiliti. I limiti di confidenza sono elencati nel QC-Report accluso al kit.
14. Non mescolare i componenti del kit con numeri di lotto diversi all'interno di un test e non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza indicata sulle etichette del kit.
15. Evitare il contatto con Stop solution contenente 0,25 M H₂SO₄. Può provocare irritazione cutanea e ustioni. In caso di contatto con gli occhi o la pelle, sciacquare immediatamente con acqua.
16. Il substrato TMB ha un effetto irritante sulla pelle e sulla mucosa. In caso di possibile contatto, lavare gli occhi con abbondante acqua e la pelle con sapone e abbondante acqua. Sciacquare gli articoli contaminati prima di riutilizzarli.
17. Per informazioni sulle sostanze pericolose incluse nel kit, fare riferimento alla Scheda dei dati di sicurezza (SDS). La scheda di sicurezza di questo prodotto è resa disponibile direttamente sul sito web del fabbricante o su richiesta.
18. I reagenti del kit devono essere considerati rifiuti pericolosi e smaltiti secondo le normative nazionali.
19. I valori di riferimento attesi riportati in queste istruzioni per il test sono solo indicativi. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i propri intervalli di riferimento.
20. In caso di gravi danni al kit o ai componenti del saggio, il fabbricante deve essere informato per iscritto, entro e non oltre una settimana dal ricevimento del kit. Singoli componenti gravemente danneggiati non devono essere utilizzati per una sessione analitica. Devono essere conservati correttamente fino a quando il fabbricante non decide cosa farne. Se si decide che non sono più indicati per le misurazioni, devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali.
21. I risultati ottenuti con questo kit di test non devono essere considerati come l'unica ragione per eventuali conseguenze terapeutiche, ma devono essere messi in relazione con altri test diagnostici e osservazioni cliniche.
22. I reagenti di questo kit contenenti siero o plasma umano sono stati testati e confermati negativi per HIV I/II, HBsAg e HCV mediante procedure approvate. Tuttavia, durante l'utilizzo e nell'eliminazione, tutti i reagenti devono essere trattati come potenziali rischi biologici.

2.2 Restrizioni

Qualsiasi manipolazione inappropriata dei campioni o modifica di questo test potrebbe influenzare i risultati.

In circa il 10% dei campioni utilizzati nel confronto metodologico, è stata rilevata una discrepanza tra le misurazioni di Kryptor CgA II e quelle di Elisa. Si trattava esclusivamente di campioni le cui concentrazioni di CgA erano comprese tra 350 e 900 µg/l.

La sequenza degli anticorpi specifici utilizzati è stata controllata per possibili reazioni crociate. Anche se non è stato possibile rilevare reattività crociate significative, non si può escludere che in rari casi individuali e a seconda dello stato del farmaco o della malattia, possano verificarsi influenze sui valori.

Se la determinazione della Cromogranina A viene utilizzata come parte del follow-up di un paziente, si consiglia la seguente procedura:

- Il campione di un paziente deve essere sempre esaminato utilizzando lo stesso metodo durante il corso del suo trattamento.
- In caso di anomalie durante il follow-up, è necessario indagare se sono subentrati cambiamenti nei farmaci o nello stile di vita.

Per qualsiasi ulteriore domanda, si prega di contattare il fabbricante.

2.2.1 Sostanze interferenti

I campioni contenenti precipitati o filamenti di fibrina potrebbero causare risultati imprecisi. La biotina (fino a 1.200 ng/ml), i campioni emolitici (fino a 1 mg/ml di emoglobina), i campioni itterici (fino a 50 mg/dl di bilirubina) e i campioni lipemici (fino a 1.700 mg/dl di trigliceridi) non influiscono sui risultati del saggio.

In caso di dubbio, si raccomanda di non utilizzare campioni emolitici, itterici e lipemici nel saggio.

2.2.2 Interferenze farmacologiche

Farmaci come gli inibitori della pompa protonica, gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina, gli antagonisti del recettore dell'istamina di tipo 2 e gli analoghi della somatostatina possono influenzare il livello di CgA nel siero.

2.2.3 Effetto High-Dose-Hook

In questo test non è stato osservato alcun effetto hook.

3 CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare il kit e i reagenti a 2 – 8 °C fino alla data di scadenza. Non usare il kit dopo la data di scadenza indicata sulle etichette del kit. Una volta aperti, i reagenti sono stabili per 2 mesi se conservati a temperature tra 2 °C e 8 °C. Una volta aperta la busta richiudibile della piastra ELISA, occorre prestare attenzione a richiuderla ermeticamente includendo l'essiccante.

4 MATERIALI

4.1 Contenuto del kit

	WASH-CONC 50x	Tampone concentrato per il lavaggio – concentrazione 50x
Contenuto:	Soluzione tampone con detergente non ionico e pH fisiologico	
Volume:	1 x 20 ml/flaconcino, tappo porpora	
	SUBSTRATE	Substrato – pronto all'uso
Contenuto:	Substrato cromogenico contenente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, tampone per substrato e perossido di idrogeno	
Volume:	1 x 12 ml/flaconcino, tappo nero	
	STOP-SOLN	Stop Solution – pronta all'uso
Contenuto:	0,25 M acido solforico	
Volume:	1 x 12 ml/flaconcino, tappo grigio	
	CONJUGATE	Anticorpo coniugato – pronto all'uso
Contenuto:	Anticorpo anti-cromogranina A di coniglio, coniugato con perossidasi	
Volume:	1 x 6 ml/flaconcino, tappo rosso	
Descrizione:	La specie è il coniglio	
	ASSAY-BUFF	Tampone del saggio – pronto all'uso
Contenuto:	Soluzione tampone con proteine e conservanti non al mercurio	
Volume:	1 x 50 ml/flaconcino, tappo blu	
Descrizione:	Le specie di proteine nel tampone sono bovine	
	LI 96	Strisce per la microtitolazione della serotonina – pronte all'uso
Contenuto:	1 piastra con 96 pozzetti (12x8) rivestiti con anticorpo anti-cromogranina A di capra in un sacchetto richiudibile con essiccante	
Descrizione:	La specie è caprina	

4.2 Taratura e Controlli

Norme e controlli – pronti all'uso

No. cat.	Componente	Colore/tappo	Concentrazione [$\mu\text{g/l}$] di CgA	Volume/ Flaconcino
	STANDARD A	bianco	0	1 ml
	STANDARD B	giallo	30	1 ml
	STANDARD C	arancione	110	1 ml
	STANDARD D	blu	450	1 ml
	STANDARD E	grigio	900	1 ml
	CONTROL 1	verde	Fare riferimento al QC-Report per il valore atteso e il range accettabile.	1 ml
	CONTROL 2	rosso		1 ml

Contenuto: Tampone del saggio con una quantità definita di Cromogranina A umana e proteina stabilizzante.

Descrizione: La Cromogranina A è derivata dall'uomo, la proteina stabilizzante è di origine bovina.

4.3 Materiali aggiuntivi richiesti ma non forniti nel kit

- Acqua (deionizzata, distillata o ultrapura)
- Materiale assorbente (carta assorbente)

4.4 Dotazione aggiuntiva richiesta ma non acclusa al kit

- Pipette di precisione calibrate per erogare volumi compresi tra 20 μl e 400 μl
- Dispositivo per il lavaggio di piastre per microtitolazione (manuale, semiautomatico o automatizzato)
- Lettore ELISA in grado di leggere assorbanza a 450 nm e se possibile a 620 – 650 nm
- Agitatore per piastre da microtitolazione (ampiezza di agitazione 3 mm; circa 600 giri/min)
- Agitatore a vortice

5 RACCOLTA, MANIPOLAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Siero

Prelevare il sangue mediante puntura endovenosa, lasciare coagulare e separare il siero mediante centrifugazione secondo le istruzioni del fabbricante. Non centrifugare prima che la coagulazione sia completa. I pazienti sottoposti a terapia anticoagulante possono richiedere un aumento del tempo di coagulazione.

In caso di dubbio, si raccomanda di non utilizzare campioni emolitici, itterici e lipemici nel saggio (cfr. 2.2.1).

Conservazione: fino a 2 giorni a 2 – 8 °C; conservazione per un periodo più lungo (fino a 6 mesi) a -20 °C.

Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti.

6 PROCEDURA DI PROVA

Lasciare che tutti i reagenti e i campioni raggiungano la temperatura ambiente e miscelare accuratamente capovolgendo delicatamente prima dell'uso. Numerare le piastre a pozzetti (le strisce per microtitolazione rimosse dal telaio per l'uso devono essere adeguatamente contrassegnate per evitare scambi). Si raccomanda di duplicare le determinazioni.

Il legame degli antisieri e del coniugato enzimatico nonché l'attività dell'enzima dipendono dalla temperatura. Maggiore è la temperatura, maggiori saranno i valori di assorbimento. Tempi di incubazione variabili avranno influenze simili sull'assorbanza. La temperatura ottimale durante il saggio immunoenzimatico è compresa tra 20 °C – 25 °C.

⚠ È obbligatorio l'uso di un agitatore per piastre da microtitolazione con le seguenti specifiche: ampiezza di scuotimento 3 mm; circa 600 giri/min. Agitare con impostazioni diverse potrebbe influenzare i risultati.

6.1 Preparazione dei reagenti e ulteriori note

Tampone di lavaggio

Diluire il Concentrato di tampone per il lavaggio da 20 ml WASH-CONC 50X con acqua fino a un volume finale di 1.000 ml.

Conservazione: 2 mesi a 2 – 8 °C

Strisce per microtitolazione con Cromogranina A

In rari casi i residui del reagente di blocco e stabilizzazione possono rimanere visibili nei pozzetti sotto forma di piccoli punti o linee di colore bianco. Questi residui non influiscono sulla qualità del prodotto.

6.2 Preparazione dei campioni – Diluizione

- Prima dell'uso, i campioni di siero devono essere diluiti 1+20 con ASSAY-BUFF ad es. 20 µl di campione di siero + 400 µl di ASSAY-BUFF.
Anche i campioni di siero che sono risultati fuori curva devono essere diluiti allo stesso modo con ASSAY-BUFF e ridosati.

6.3 Chromogranin A ELISA

- Pipettare **50 µl** degli **standard, dei controlli** e dei **campioni diluiti** negli appositi pozzetti delle **Strisce per la microtitolazione della Cromogranina A** **LI 96** e incubare per **1 h** a **TA** (20 – 25 °C) su un **agitatore** (ca. 600 giri/min).
 - Eliminare o aspirare il contenuto dei pozzetti. Lavare la piastra **4 volte** aggiungendo **300 µl** di **tampone di lavaggio, scartando** il contenuto e **asciugando ogni volta** picchiando la piastra capovolta su materiale assorbente.
 - Pipettare **50 µl** del **CONJUGATE** in tutti i pozzetti e incubare per **1 ora** a **TA** (20 – 25 °C) su un **agitatore** (ca. 600 giri/min).
 - Eliminare o aspirare il contenuto dei pozzetti. Lavare la piastra **4 volte** aggiungendo **300 µl** di **tampone di lavaggio, scartando** il contenuto e **asciugando ogni volta** picchiando la piastra capovolta su materiale assorbente.
 - Pipettare **100 µl** di **SUBSTRATE** in tutti i pozzetti.
 - Incubare per **25 ± 5 min** a **TA** (20 – 25 °C) su un **agitatore** (ca. 600 giri/min).
- ⚠ Evitare l'esposizione alla luce solare diretta!**
- Aggiungere **100 µl** di **STOP-SOLN** a tutti i pozzetti e agitare la piastra per microtitolazione per un breve lasso di tempo.
 - Leggere** l'assorbanza della soluzione nei pozzetti entro 10 minuti utilizzando un lettore di piastre per microtitolazione impostato a **450 nm** (se disponibile, si consiglia una lunghezza d'onda di riferimento compresa tra 620 nm e 650 nm).

7 CALCOLO DEI RISULTATI

Intervallo di misurazione	Cromogranina A nel siero
	2,3 – 900 µg/l

La curva standard, che può essere utilizzata per determinare la concentrazione dei campioni non noti, si ottiene tracciando le letture di assorbanza (calcolare l'assorbanza media) degli standard (lineare, asse y) rispetto alle corrispondenti concentrazioni standard (logaritmica, asse x) utilizzando una concentrazione di 0,001 µg/l per lo standard A (questo allineamento è obbligatorio a causa della presentazione logaritmica dei dati). Utilizzare la regressione non lineare per l'adattamento della curva (ad es. 4 parametri, marquardt).

Le concentrazioni dei campioni e dei controlli possono essere lette direttamente dalla curva standard.

I campioni trovati con concentrazioni superiori allo standard più elevato (Standard E) devono essere adeguatamente diluiti con **ASSAY-BUFF** e nuovamente analizzati.

7.1 Valore di riferimento atteso

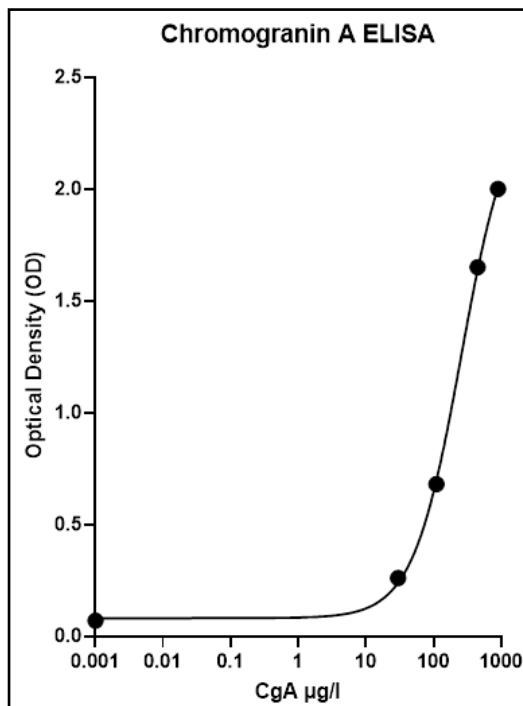
Si raccomanda vivamente che ogni laboratorio stabilisca i propri valori di riferimento.

I valori di riferimento attesi indicati in basso si basano su studi di comparazione tra metodi con B·R·A·H·M·S Kryptor CgA II. Il valore di riferimento atteso è stato determinato in uno studio di van Treijen, M.J.C., et al. [7].

	Cromogranina A nel siero
Valore di riferimento (ULN)	< 100 µg/l
Range patologico tipico	Fino a 143.500 µg/l

7.2 Curva standard tipica

⚠ *Esempio: Non utilizzare per il calcolo!*



8 CAMPIONI DI CONTROLLO

Si raccomanda di utilizzare campioni di controllo secondo le normative nazionali. Utilizzare i controlli sia a livello normale che patologico. I campioni di controllo ottenuti commercialmente devono essere trattati come campioni non noti. I campioni di controllo devono rientrare nei limiti di confidenza stabiliti. I limiti di confidenza dei controlli del kit sono indicati sul QC-Report.

9 CARATTERISTICHE DEL SAGGIO

9.1 Dati delle prestazioni

Sensibilità analitica	
Limite del bianco (LOB)	0,9 µg/l
Limite di rilevazione (LOD)	1,4 µg/l
Limite di quantificazione (LOQ)	2,3 µg/l

Precisione					
Intra-analisi			Inter-analisi		
n = 12			n = 10		
Campione	Media ± DS [µg/ml]	CV [%]	Campione	Media ± DS [µg/ml]	CV [%]
1	43,6 ± 1,2	2,8	1	73,0 ± 3,8	5,2
2	73,5 ± 3,0	4,2	2	102 ± 3,5	3,5
3	103 ± 3,4	3,3	3	161 ± 5,7	3,6
4	161 ± 10,1	6,3	4	300 ± 16,0	5,3
5	283 ± 14,6	5,1			
6	502 ± 15,9	3,2			

Da lotto a lotto			
	Campione	Media ± DS [µg/ml]	CV [%]
Cromogranina A nel siero (n = 3)	1	46,3 ± 2,3	5,1
	2	111 ± 7,2	6,5
	3	479 ± 61,8	12,9

Recupero			
	Range [µg/l]	Media [%]	Range [%]
Cromogranina A	43,6 – 502	102	100 – 104

Linearità			
	Diluizione di serie fino a	Media [%]	Range [%]
Cromogranina A	1:64	92	91 – 96

Confronto metodologico: B·R·A·H·M·S Kryptor CgA II	CgA ELISA = 1,05 x (Kryptor CgA II) – 15; R ² = 0,97; n = 57
---	---

Prestazioni diagnostiche GEP-NET [7]			
Specificità diagnostica [%]	Sensibilità diagnostica [%]	Valore predittivo positivo (VPP) [%]	Valore predittivo negativo (NPV) [%]
83	56	87	49
Rapporto di verosimiglianza positivo (LR+)		Rapporto di verosimiglianza negativo (LR-)	
3,3		0,53	

9.2 Tracciabilità metrologica

I valori assegnati agli standard e ai controlli della Chromogranin A ELISA sono riconducibili al metodo di riferimento B·R·A·H·M·S Kryptor CgA II.

Standard e controlli	Incertezza [%]
	7,5

Chromogranin A ELISA	Incertezza espansa [%] k = 2*
	16,5

*Definisce un intervallo sul risultato misurato che includerà il valore vero con una probabilità del 95%.

10 REFERENCES / LITERATURE / REFERENZEN/LITERATUR

1. O'Toole, D., et al., ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: biochemical markers. *Neuroendocrinology*, 2009. 90(2): p. 194-202.
2. Verbeek, W.H., C.M. Korse, and M.E. Tesselaar, GEP-NETs UPDATE: Secreting gastro-enteropancreatic neuroendocrine tumours and biomarkers. *Eur J Endocrinol*, 2016. 174(1): p. R1-7.
3. Singh, S. and C. Law, Chromogranin A: a sensitive biomarker for the detection and post-treatment monitoring of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012. 6(3): p. 313-34.
4. Louthan, O., Chromogranin a in physiology and oncology. *Folia Biol (Praha)*, 2011. 57(5): p. 173-81.
5. Yang, X., et al., Diagnostic value of circulating chromogranin a for neuroendocrine tumors: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2015. 10(4): p. e0124884.
6. Corti, A., F. Marcucci, and T. Bachetti, Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. *Pflugers Arch*, 2018. 470(1): p. 199-210.
7. van Treijen, M.J.C., et al., Blood Transcript Profiling for the Detection of Neuroendocrine Tumors: Results of a Large Independent Validation Study. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. 9: p. 740.

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

Once EUDAMED is fully in place, the Summary of Safety and Performance can be found here:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.




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

Sobald EUDAMED vollständig eingerichtet ist, finden Sie den Kurzbericht über Sicherheit und Leistung hier:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

Per la documentazione aggiornata o qualsiasi altra informazione si prega di contattare il proprio fornitore locale.

Non appena EUDAMED sarà completamente operativo, troverete il breve rapporto sulla sicurezza e sulle prestazioni qui:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

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 *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro 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 *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks*	Biologische Risiken*	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité