



Hu Chromogranin A ELISA

KAPEPKT812

LOT : 160727/1



Human Chromogranin A ELISA Kit

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for the measurement of
Human Chromogranin A Levels in Serum

KAPEPKT812

IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

INTENDED USE

This ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kit is intended for the quantitative determination of human chromogranin A levels in patient serum samples. This assay exclusively measures human chromogranin A without high dose "hook" effect up to 1,000,000 ng/ml. The test might be used as an aid for detecting pheochromocytoma and neuroendocrine tumors in patients.

SUMMARY OF PHYSIOLOGY

Chromogranin A is a 49 kDa acidic protein that consists of 439 amino acids encoded on chromosome 14. Chromogranin A has been identified in a number of normal and neoplastic endocrine tissues. It was demonstrated that an elevated circulating chromogranin A level would be a marker of tumors of neuroendocrine origin. However, the most significant clinical use of chromogranin A is related to the diagnostic procedure in patients of pheochromocytoma. The following is a short summary of potential use of chromogranin A.

1. A very sensitive (83%) and highly specific (96%) marker in the evaluation of actual or suspected pheochromocytoma. Drugs commonly used in the diagnosis or treatment of pheochromocytoma have little effect on the plasma chromogranin A level. This means that it is a great advantage to measure chromogranin A in stead of catecholamines.
2. To ascertain the source of a tumor. A high chromogranin A level indicates that the tumor arises from neuroendocrine tissues.
3. Endocrine tumors that do not produce their specific hormones, for example, calcitonin negative but chromogranin A positive C-cell carcinoma; zero-cell carcinoma; beta-cell carcinoma; parathyroid carcinoma.

ASSAY PRINCIPLE

This ELISA is designed, developed and produced for the quantitative measurement of human chromogranin A in serum samples. The assay utilizes the two-site "sandwich" technique with two selected antibodies that bind to different epitopes of human chromogranin A.

Assay calibrators, controls and patient samples are directly added to the microtiter wells of a microplate coated with a polyclonal anti-chromogranin A antibody. After the first incubation period, the antibody fixed on the wall of the microtiter well captures human chromogranin A in the sample. Remaining unbound proteins in the microtiter wells are washed away. Then a horseradish peroxidase (HRP) labeled monoclonal anti-human chromogranin A antibody is added to each microtiter well and a "sandwich" of "monoclonal antibody - human chromogranin A - polyclonal antibody" is formed. The unbound monoclonal antibody is removed in the subsequent washing step. The well is incubated with a substrate solution in a timed interval, the reaction is stopped and the developed colour is measured in a spectrophotometric microplate reader. The enzymatic activity of the immunocomplex bound to the chromogranin A on the wall of the microtiter well is directly proportional to the amount of chromogranin A in the sample. A calibration curve is generated by plotting the absorbance versus the respective human chromogranin A concentration for each calibrator on point-to-point or cubical scales or 4 parameter curve fit. The concentration of human chromogranin A in test samples is determined directly from this calibration curve.

REAGENTS: Preparation and Storage

This test kit must be stored at 2 – 8°C upon receipt. For the expiration date of the kit refer to the label on the kit box. All components are stable until this expiration date.

Prior to use allow all reagents to come to room temperature. Reagents from different kit lot numbers should not be combined or interchanged.

1. Anti-CgA Antibody Coated Microplate

One microplate with 12x8 strips (96 wells total) coated with antibody to human chromogranin A. The plate is framed and sealed in a foil Ziploc bag with a desiccant. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

2. | | | | |----|-----|------| | Ab | HRP | CONC | |----|-----|------| Detecting Antibody

One vial containing 0.6 mL HRP labeled anti-human chromogranin A antibody in a stabilized protein matrix. This reagent must be diluted with dilution buffer before use. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

3. | | | |-----|-----| | DIL | BUF | |-----|-----| Dilution buffer

One vial containing 12 mL ready to use buffer. It should be only used for detecting antibody dilution according to the assay procedures. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

4. | | | |-----|-----| | INC | BUF | |-----|-----| Incubation buffer

One bottle containing 30 mL of ready to use phosphate buffered saline based incubation buffer with bovine serum albumin. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

5. | | | | |------|------|------| | WASH | SOLN | CONC | |------|------|------| Washing buffer

One bottle containing 30 mL of a 30 fold concentrate. Before use the contents must be diluted with 870 mL of distilled water and mixed well. Upon dilution this yields a working wash solution containing a surfactant in phosphate buffered saline with a non-azide preservative. The diluted solution should be stored at room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.

6. | | | |-------|-----| | CHROM | TMB | |-------|-----| TMB-Substrate solution

One bottle containing 12 mL of tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

7. | | | |------|------| | STOP | SOLN | |------|------| Stop Solution

One bottle containing 12 mL of 0.5 M sulfuric acid. This reagent should be stored at 2 – 8°C or room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.

8. | | | |-----|---| | CAL | N | |-----|---| Calibrators 0 - 4

Five vials, each containing human chromogranin A in a lyophilized bovine serum based matrix with a non-azide preservative. **Refer to vial for exact concentration for each calibrator.** These reagents should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

9. | | | |---------|---| | CONTROL | N | |---------|---| Controls 1 - 2

Two vials, each containing human chromogranin A in a lyophilized bovine serum based matrix with a non-azide preservative. **Refer to vials for exact concentration range for each control.** Both controls should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

SAFETY PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use.

Source material from which reagents of bovine serum was derived in the contiguous 48 United States. It was obtained only from donor health animals maintained under veterinary supervision and found free of contagious diseases. Wear gloves while performing this assay and handle these reagents as if they are potential infectious. Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide, or sulfuric acid. TMB may cause irritation to skin and mucous membranes and cause an allergic skin reaction. TMB is a suspected carcinogen. Sulfuric acid may cause severe irritation on contact with skin. Do not get in eyes, on skin, or on clothing. Do not ingest or inhale fumes. On contact, flush with copious amounts of water for at least 15 minutes. Use Good Laboratory Practices.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Precision single channel pipettes capable of delivering 10 µL, 50 µL, 100 µL, and 1000 µL etc.
2. Repeating dispenser suitable for delivering 100 µL.
3. Disposable pipette tips suitable for above volume dispensing.
4. Disposable 12 x 75 mm or 13 x 100 glass tubes.
5. Disposable plastic 100 mL and 1000 mL bottle with caps.
6. Aluminum foil.
7. Deionized or distilled water.
8. Plastic microtiter well cover or polyethylene film.
9. ELISA multichannel wash bottle or automatic (semi-automatic) washing system.
10. Spectrophotometric microplate reader capable of reading absorbance at 450 nm.

SPECIMEN COLLECTION

Only 50 µL of human serum is required for human chromogranin A measurement in duplicate. No special preparation of the individual is necessary prior to specimen collection. Whole blood should be collected and must be allowed to clot for minimum 30 minutes at room temperature before the serum is separated by centrifugation (850 – 1500xg for 10 minutes). The serum should be separated from the clot within three hours of blood collection and transferred to a clean test tube. Serum samples should be stored at –20°C or below until measurement. Avoid repeated (more than three times) freezing and thawing of specimen.

ASSAY PROCEDURE

1. Reagent Preparation

- (1) Prior to use allow all reagents to come to room temperature. Reagents from different kit lot numbers should not be combined or interchanged.
- (2) Washing buffer must be diluted to working wash solution prior to use. Please see REAGENTS section for details.
- (3) Reconstitute all assay calibrators and controls by adding **0.5 mL** of demineralized water to each vial. Allow the calibrators and controls to sit undisturbed for 10 minutes, and then mix well by inversion or gentle vortexing. One must make sure that all solid is dissolved completely prior to use. These reconstituted calibrators and controls must be stored at - 20°C or below. Do not exceed 3 freeze-thaw cycles.

3. Assay Procedure

- (1) Place a sufficient number of antibody coated microwell strips in a holder to run calibrators, controls and unknown samples in duplicate.
- (2) Test Configuration

ROW	STRIP 1	STRIP 2	STRIP 3
A	CAL 0	CAL 4	SAMPLE 2
B	CAL 0	CAL 4	SAMPLE 2
C	CAL 1	C 1	SAMPLE 3
D	CAL 1	C 1	SAMPLE 3
E	CAL 2	C 2	SAMPLE 4
F	CAL 2	C 2	SAMPLE 4
G	CAL 3	SAMPLE 1	
H	CAL 3	SAMPLE 1	

- (3) Add 25 µL of calibrators, controls and patient samples into the designated microwell.
- (4) Add 100 µL of incubation buffer to each well
- (5) Cover the plate with a plate sealer and incubate the plate with orbital shaking (170 rpm) at room temperature for 2 hours.
- (6) Prepare Detecting antibody working solution by diluting the detecting antibody 1:21 with the dilution buffer. For each strip, 1 mL of the dilution buffer with 50 µL of the antibody is required, in a clean test tube or vial.

The table below shows the amount of antibody working solution that is required for a number of strips.

Strip no.	Dilution buffer	Detecting Antibody
1	1 mL	50 µL
2	2 mL	100 µL
3	3 mL	150 µL
4	4 mL	200 µL
5	5 mL	250 µL
6	6 mL	300 µL
7	7 mL	350 µL
8	8 mL	400 µL
9	9 mL	450 µL
10	10 mL	500 µL
11	11 mL	550 µL
12	12 mL	600 µL

Note: this detecting antibody working solution should be freshly prepared right before running the assay.

- (7) Remove plate sealer. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 350 µL of working wash solution into each well and then completely aspirate the contents. Alternatively, an automated microplate washer can be used.
- (8) Add 100 µL of above diluted Detecting Antibody working solution to each well.
- (9) Cover the plate with the plate sealer and incubate plate with orbital shaking (170 rpm) at room temperature for 1 hour.
- (10) Remove plate sealer. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 350 µL of working wash solution into each well and then completely aspirate the contents. Alternatively, an automated microplate washer can be used.
- (11) Add 100 µL of TMB-Substrate solution into each well.
- (12) Cover the plate with a plate sealer and with an aluminum foil to avoid exposure to light.
- (13) Incubate plate at room temperature for 20 minutes
- (14) Remove the aluminum foil and plate sealer. Add 100 µL of Stop Solution into each well. Mix gently.
- (15) Read the absorbance at 450 nm within 10 minutes in a microplate reader

NOTE: to reduce the background, one can set the instrument to dual wavelength measurement at 450 nm with background wavelength correction set at 595 nm or 620 nm or 630 nm.

PROCEDURAL NOTES

1. It is recommended that all calibrators, controls and unknown samples are assayed in duplicate. The average absorbance reading of each duplicate should be used for data reduction and the calculation of the results.
2. Keep light sensitive reagents in the original amber bottles.
3. Store any unused antibody coated strips in the foil Ziploc bag with desiccant to protect from moisture.
4. Careful technique and use of properly calibrated pipetting devices are necessary to ensure reproducibility of the test.
5. Incubation times or temperatures other than those stated in this insert may affect the results.
6. Avoid air bubbles in the microwell as this could result in lower binding efficiency and higher CV% of duplicate reading
7. All reagents should be mixed gently and thoroughly prior to use. Avoid foaming.

INTERPRETATION OF RESULTS

1. Calculate the average absorbance for each pair of duplicate test results.
2. Subtract the average absorbance of the CAL 0 (0 ng/mL) from the average absorbance of all other readings to obtain the corrected absorbance.
3. The calibration curve is generated by the corrected absorbance of all calibrators on the ordinate against the calibrator concentration on the abscissa using point-to-point or log-log paper. Appropriate computer assisted data reduction programs may also be used for the calculation of the results.

The human chromogranin A concentrations for the controls and patient samples are read directly from the calibration curve using their respective corrected absorbance.

REPORTING TEST RESULTS

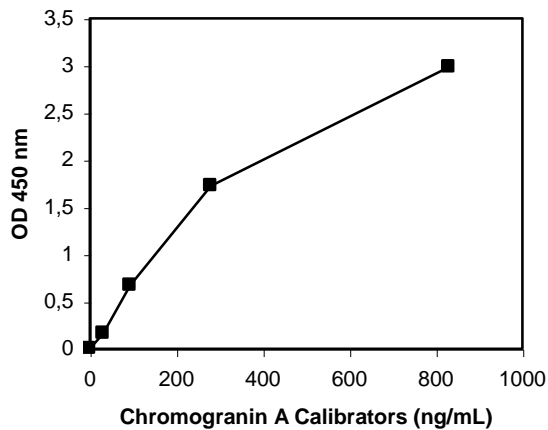
Laboratory should report test results directly derived from the assay. For samples showing high values, it is strongly recommended to dilute the patient sample 1:100 with incubation buffer and re-assay the diluted sample for a more accurate test result. If the 1:100 diluted sample still shows a higher value than that of the highest assay standard, one can either report the sample value as greater than the highest assay standard (e.g. > 56,000 ng/ml) or further measure a 1:10,000 diluted sample.

EXAMPLE DATA AND CALIBRATION CURVE

A typical absorbance data and the resulting calibration curve from human chromogranin A ELISA are shown below. **This curve should never be used instead of the real time calibration curve.**

Well I.D.	OD 450 nm Absorbance			Results ng/mL
	Readings	Average	Corrected	
0 ng/mL	0.078 0.074	0.076	0.000	
31 ng/mL	0.242 0.239	0.240	0.164	
93 ng/mL	0.757 0.740	0.748	0.672	
280 ng/mL	1.840 1.763	1.802	1.726	
830 ng/mL	3.139 2.980	3.059	2.983	
Control 1	0.444 0.451	0.447	0.371	56.27 ng/mL
Control 2	1.300 1.252	1.276	1.200	186.70 ng/mL

Human Chromogranin A ELISA



EXPECTED VALUES

Seventy-two normal adult sera were measured with this human chromogranin A ELISA. The normal values were below 100 ng/mL. Five patients with pheochromocytoma showed a chromogranin A level of over 100 ng/ml and one of them reached 330,000 ng/mL. It is highly recommend that each laboratory establishes its own normal cut off level.

Although a serum chromogranin A level above 100 ng/ml would be an aid in clinical diagnosis, it is recommended to establish a baseline level of chromogranin A for each patient for monitoring cancer patients after surgery. A clear surge of chromogranin A level would indicate an increased cancer cell activity.

LIMITATION OF THE PROCEDURE

- Since there is no Gold Calibrator available for human chromogranin A measurement, the values of the calibrators were established by correlation to a highly purified chromogranin A calibrator.
- If a sample value is higher than the highest calibrator, it is recommended to measure a further diluted sample.
- Bacterial or fungal contamination of serum specimens or reagents, or cross contamination between reagents may cause erroneous results.
- Water deionized with polyester resins may inactivate the horseradish peroxidase enzyme.

QUALITY CONTROL

To assure the validity of the results each assay should include adequate controls with known chromogranin A levels. We recommend that all assays include the laboratory's own chromogranin A controls in addition to those provided with this kit.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

The sensitivity of the human chromogranin A ELISA, as determined by the 95% confidence limit on 20 duplicate determinations of the zero calibrator, is approximately 5 ng/mL.

High Dose "hook" effect

This assay has showed that it did not have any high dose "hook" effect up to 1,000,000 ng/mL. This is important because some patients with pheochromocytoma had over 300,000 ng/mL of chromogranin A level in their serum sample.

Precision

The intra-assay precision is validated by measuring two controls samples in a single assay with 20-replicate determinations.

Mean Chromogranin A Value (ng/mL)	CV (%)
63.5	4.2
209.	3.6

The inter-assay precision is validated by measuring two control samples in duplicate in 12 individual assays.

Mean Chromogranin A Value (ng/mL)	CV (%)
61.9	6.7
213.3	5.6

Linearity

Two human serum samples were diluted with incubation buffer and assayed. The results expressed in ng/mL are as follows:

#	DILUTION	OBSERVED VALUE	EXPECTED VALUE	RECOVERY %
1	Neat	286	-	-
	1:2	138	143	96
	1:4	75	72	104
	1:8	37.9	36	105
	1:16	19.5	18	108
2	Neat	61.8	-	-
	1:2	32.1	30.9	104
	1:4	15.9	15.5	103
	1:8	7.2	7.7	94

Recovery

Two patient serum samples were spiked with various amounts of human chromogranin A (1 vol. + 1 vol. mixture) and assayed. The results expressed in ng/mL are as follows:

#	Orig. Value	Amount Spiked	Observed Value	Expected Value	Recovery %
1	62.8	31	45.2	46.9	96
		93	75.6	77.9	97
		280	152.8	171.4	89
2	289	31	152.2	160	95
		93	176	191	92
		280	288.2	284.5	101

REFERENCES

- Pirker RA, Pont J, Pöhl R, Schütz W, Griesmacher A, Müller MM. Usefulness of chromogranin A as a marker for detection of relapses of carcinoid tumours. Clin Chem Lab Med 1998;36:837-40.
- Kimura N, Miura W, Noshiro T, Mizunashi K, Hanew K, Shimizu K, et al. Plasma chromogranin A in pheochromocytoma, primary hyperparathyroidism and pituitary adenoma in comparison with catecholamine, parathyroid hormone and pituitary hormones. Endocr J 1997;44:319-27.
- Hendy GN, Bevan S, Mattei MG, Moulard AJ. Chromogranin A. Clin Invest Med 1995;18:47-65.
- Defetos LJ. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. Endocrine Reviews: 1991;12:181-7
- Sobol RE, Memoli V, Defetos LJ. Hormone-negative, chromogranin A-positive endocrine tumors. N Engl J Med 1989;320:444-7.

Short Assay Procedure:

1. Add 25 μ L of calibrators, controls and patient serum samples into the designated microwell.
 2. Add 100 μ L of incubation buffer to each well.
 3. Mix, cover and incubate the plate at room temperature and shaking (170 rpm) for 2 hours.
 4. Wash each well 5 times.
 5. Add 100 μ L of Diluted Detecting Antibody into each well
 6. Incubate 1 hour at RT and shaking (170 rpm)
 7. Wash each well 5 times.
 8. Add 100 μ L of TMB-Substrate solution into each well.
 9. Cover and incubate plate at room temperature for 20 minutes.
 10. Add 100 μ L of Stop Solution into each well.
 11. Read the absorbance at 450 nm.
-
-

Revision date : 2016-07-27



Trousse ELISA chromogranine A humaine

fr

Essai d'immuno-absorption enzymatique (ELISA) pour mesurer
les taux de chromogranine A humaine dans le sérum

KAPEPKT812

DIAGNOSTIC IN VITRO

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

BUT DU DOSAGE

Cette trousses ELISA (essai d'immuno-absorption enzymatique) est destinée à la détermination quantitative des taux en chromogranine A humaine dans des échantillons sériques de patients. Cet essai mesure exclusivement la chromogranine A humaine, sans effet "crochet" à haute concentration, jusqu'à 1.000.000 ng/mL. Le test peut être utilisé comme aide dans la détection du phéochromocytome et des tumeurs endocrines.

RÉSUMÉ DE LA PHYSIOLOGIE

La chromogranine A est une protéine acide de 49 kDa constituée de 439 acides aminés codés par le chromosome 14. La chromogranine A a été identifiée dans un certain nombre de tissus endocrines normaux et néoplasiques. Il a été démontré qu'un taux élevé en chromogranine A circulante est un marqueur de tumeurs d'origine neuroendocrine. Cependant, l'application clinique la plus significative de la chromogranine A est liée à la procédure diagnostique chez les patients porteurs d'un phéochromocytome. La suite est un bref résumé des utilisations potentielles de la chromogranine A.

1. Un marqueur très sensible (83%) et hautement spécifique (96%) dans l'évaluation de phéochromocytomes avérés ou suspects. Les médicaments communément utilisés dans le diagnostic ou le traitement du phéochromocytome ont peu d'effet sur le taux plasmatique de la chromogranine A. Cela signifie qu'il est de loin préférable de mesurer la chromogranine A au lieu des catécholamines.
2. Pour établir l'origine d'une tumeur. Un taux élevé en chromogranine A indique que la tumeur provient des tissus neuro-endocrines.
3. Les tumeurs endocrines qui ne produisent pas leurs hormones spécifiques, par exemple les carcinomes à cellules C calcitonine négatives, mais chromogranine A positives, les carcinomes à cellules zéro, les carcinomes à cellules bêta, les carcinomes parathyroïdiens.

PRINCIPE DE L'ANALYSE

Cet ELISA est conçu, développé et produit pour la mesure quantitative de la chromogranine A humaine dans des échantillons de sérum. Cet essai utilise la technique "sandwich" à deux sites avec deux anticorps sélectifs qui lient des épitopes différents de la chromogranine A humaine.

Les calibrateurs de l'essai, les contrôles et les échantillons de patient sont directement ajoutés aux puits d'une plaque de microtitration tapissée d'un anticorps polyclonal anti-chromogranine A. Après la première période d'incubation, l'anticorps fixé à la paroi des puits de microtitration capture la chromogranine A humaine présente dans l'échantillon. Les protéines restantes non liées sont éliminées des puits de microtitration par lavage. Une peroxydase de raifort (HRP) marquée à un anticorps monoclonal anti-chromogranine A humaine est ensuite ajoutée à chacun des puits de microtitration et il se forme un "sandwich" "anticorps monoclonal – chromogranine A humaine – anticorps polyclonal". L'anticorps monoclonal non lié est éliminé dans l'étape de lavage suivante. Le puits est incubé avec une solution de substrat pendant un certain temps. La réaction est arrêtée et la couleur développée mesurée dans un lecteur spectrophotométrique de plaques de microtitration. L'activité enzymatique de l'immuno-complexe lié à la chromogranine A sur la paroi du puits de la plaque de microtitration est directement proportionnelle à la quantité de chromogranine A présente dans l'échantillon. La courbe de calibration est générée en reportant l'absorbance en fonction de la concentration correspondante en chromogranine A humaine de chacun des calibrateurs sur une courbe point à point ou cubique ou une courbe à 4 paramètres. La concentration en chromogranine A humaine des échantillons analysés est directement déterminée à partir de la courbe de calibration.

RÉACTIFS: Préparation et conservation

Cette trousses d'analyse doit être conservée entre 2 et 8°C dès la réception. Pour la date d'expiration de la trousses, se référer à l'étiquette se trouvant sur la boîte d'emballage de la trousses. Tous les composants sont stables jusqu'à la date d'expiration.

Avant utilisation, laisser les réactifs se mettre à température ambiante. Ne pas combiner ou substituer des réactifs portant des numéros de lot différents.

1. | | |-----| | TTT | |-----| Plaque de microtitration tapissée d'anticorps anti-CgA

Une plaque de microtitration de 12x8 barrettes (96 puits au total) tapissées d'anticorps anti-chromogranine A humaine. La plaque se trouve dans un support et est scellée dans un sachet d'aluminium refermable (Ziploc) contenant un dessiccateur. Ce réactif doit être conservé entre 2 et 8°C. Il est stable jusqu'à la date d'expiration inscrite sur la boîte d'emballage de la trousses.

2. | | | | |----|-----|------| | Ab | HRP | CONC | |----|-----|------| Anticorps de détection

Une fiole contenant 0,6 mL d'anticorps anti-chromogranine A humaine marqués à la HRP dans une matrice protéique stabilisée. Ce réactif doit être dilué avec le tampon de dilution avant d'être utilisé. Ce réactif doit être conservé entre 2 et 8°C et est stable jusqu'à la date d'expiration inscrite sur la boîte d'emballage de la trousses.

3. | | | |-----|-----| | DIL | BUF | |-----|-----| Tampon de dilution

Une fiole contenant 12 mL de tampon prêt à l'emploi. Il doit n'être utilisé que pour diluer les anticorps de détection conformément aux procédures de l'essai. Ce réactif doit être conservé entre 2 et 8°C et est stable jusqu'à la date d'expiration inscrite sur la boîte d'emballage de la trousses.

4. | | | |-----|-----| | INC | BUF | |-----|-----| Tampon d'incubation

Un flacon contenant 30 mL de tampon d'incubation prêt à l'emploi: une solution saline tamponnée au phosphate avec de la sérum-albumine bovine. Ce réactif doit être conservé entre 2 et 8°C et est stable jusqu'à la date d'expiration inscrite sur la boîte d'emballage de la trousses.

5. | | | | |------|------|------| | WASH | SOLN | CONC | |------|------|------| Tampon de lavage

Un flacon contenant 30 mL de tampon concentré trente fois. Avant utilisation, le contenu doit être dilué avec 870 mL d'eau distillée et bien mélangé. Une fois dilué, on obtient une solution de lavage de travail contenant un surfactant dans une solution saline tamponnée au phosphate avec un agent conservateur non-azoture. La solution diluée doit être conservée à température ambiante et est stable jusqu'à la date d'expiration inscrite sur la boîte d'emballage de la trousses.

6. | | | |-------|-----| | CHROM | TMB | |-------|-----| Solution de substrat TMB

Un flacon contenant 12 mL de tétraméthylbenzidine (TMB) avec un peroxyde d'hydrogène. Ce réactif doit être conservé entre 2 et 8°C et est stable jusqu'à la date d'expiration inscrite sur la boîte d'emballage de la trousses.

7. | | | |------|------| | STOP | SOLN | |------|------| Solution d'arrêt

Un flacon contenant 12 mL d'acide sulfurique 0,5 M. Ce réactif doit être conservé entre 2 et 8°C et est stable jusqu'à la date d'expiration inscrite sur la boîte d'emballage de la trousses.

8. | | | |-----|---| | CAL | N | |-----|---| Calibrateurs 0 - 4

Cinq fioles contenant chacune de la chromogranine A humaine dans une matrice à base de sérum bovin lyophilisé avec un agent conservateur non-azoture. **Se référer aux fioles pour la concentration exacte de chacun des calibrateurs.** Ces réactifs doivent être conservés entre 2 et 8°C et sont stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur la boîte d'emballage de la trousses.

Deux fioles contenant chacune de la chromogranine A humaine dans une matrice à base de sérum bovin lyophilisé avec un agent conservateur non-azoture. **Se référer aux fioles pour la fourchette de concentration exacte de chacun des contrôles.** Les deux contrôles doivent être conservés entre 2 et 8°C et sont stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur la boîte d'emballage de la trousse.

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

Pour un usage de diagnostic in vitro.

Le matériel-source des réactifs dérivés de sérum bovin provient des 48 états contigus des Etats-Unis. Il n'a été obtenu qu'à partir de donneurs animaux sains maintenus sous surveillance vétérinaire continue et exempts de maladie contagieuse. Portez des gants lorsque vous réalisez cet essai et manipulez ces réactifs comme s'ils étaient potentiellement dangereux. Évitez le contact avec les réactifs contenant du TMB, du peroxyde d'hydrogène ou de l'acide sulfurique. Le TMB peut provoquer une irritation de la peau et des muqueuses et provoquer des réactions cutanées allergiques. Le TMB est suspecté d'être carcinogène. L'acide sulfurique peut provoquer des irritations sévères lors du contact avec la peau. Ne pas en mettre dans les yeux, sur la peau ou sur les vêtements. Ne pas ingérer ou inhaler les vapeurs. En cas de contact, lavez abondamment à l'eau pendant au moins 15 minutes. Utilisez les bonnes pratiques de laboratoire.

MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Des pipettes monocanal de précision permettant de délivrer 10 µL, 50 µL, 100 µL et 1000 µL etc.
- Un distributeur répétitif permettant de délivrer 100µL.
- Des pointes de pipettes permettant de délivrer les volumes mentionnés ci-dessus.
- Des tubes jetables 12 x 75 ou des tubes de verre 13 x 100.
- Une bouteille en plastique jetable de 100 mL et une de 1000 mL, avec bouchons.
- Une feuille d'aluminium.
- De l'eau désionisée ou distillée.
- Un couvercle de plaque de microtitration en plastique ou un film polyéthylène.
- Un flacon de lavage multicanaux pour ELISA ou un système de lavage automatique (ou semi-automatique).
- Un lecteur spectrophotométrique de plaques de microtitration capable de lire l'absorbance à 450 nm.

PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Il ne faut que 50 µL de sérum humain pour mesurer en double la chromogranine A humaine. Aucune préparation particulière du patient n'est nécessaire avant la prise d'échantillon. Il faut prélever du sang total et celui-ci doit coaguler au moins pendant 30 minutes à température ambiante avant de séparer le sérum par centrifugation (850 à 1500xg pendant 10 minutes). Le sérum doit être séparé du caillot dans les trois heures de la prise de sang et être transféré dans un tube d'analyse propre. Les échantillons de sérum doivent être conservés à -20°C ou moins jusqu'à la mesure. Éviter les congélations et décongélations répétées de l'échantillon (plus de trois fois).

PROCÉDURE D'ANALYSE

1. Préparation des réactifs

- Avant utilisation, laisser les réactifs se mettre à température ambiante. Ne pas combiner ou substituer des réactifs portant des numéros de lots différents.
- Le tampon de lavage doit être dilué en solution de lavage de travail avant d'être utilisé. Voir le paragraphe RÉACTIFS pour les détails.
- Reconstituer tous les calibrateurs et les contrôles de l'essai en ajoutant **0,5 mL** d'eau déminéralisée à chaque tube. Laisser les calibrateurs et les contrôles reposer pendant 10 minutes et mélanger les ensuite en renversant les fioles ou en les passant doucement au vortex. Il faut être sûr que le solide est complètement dissous avant l'utilisation. Les calibrateurs et les contrôles reconstitués doivent être conservés à -20°C ou moins. Ne pas dépasser trois cycles de congélation-décongélation.

3. Procédure d'analyse

- Placer dans un support un nombre suffisant de barrettes de puits de microtitration tapissés d'anticorps pour analyser les calibrateurs, les contrôles et les échantillons inconnus en double.
- Configuration de l'analyse

LIGNE	BARRETTE 1	BARRETTE 2	BARRETTE 3
A	CAL 0	CAL 4	ÉCHANTILLON 2
B	CAL 0	CAL 4	ÉCHANTILLON 2
C	CAL 1	C 1	ÉCHANTILLON 3
D	CAL 1	C 1	ÉCHANTILLON 3
E	CAL 2	C 2	ÉCHANTILLON 4
F	CAL 2	C 2	ÉCHANTILLON 4
G	CAL 3	ÉCHANTILLON 1	
H	CAL 3	ÉCHANTILLON 1	

- Ajouter 25 µL des calibrateurs, contrôles et échantillons de patient dans les puits de microtitration désignés.
 - Ajouter 100 µL de tampon d'incubation à chacun des puits.
 - Couvrir la plaque avec un adhésif pour plaque et l'incuber sur un agitateur orbital (170 tpm) à température ambiante pendant 2 heures.
 - Préparer la solution de travail des anticorps de détection en diluant les anticorps 1:21 avec le tampon de dilution. Il faut, pour chacune des barrettes, 1 mL de tampon d'incubation avec 50 µL d'anticorps dans un tube ou une fiole d'analyse propre.
- Le tableau ci-dessous reprend la quantité de solution de travail des anticorps nécessaire pour un certain nombre de barrettes.

n° de Barrette	Tampon de dilution	Anticorps de détection
1	1 mL	50 µL
2	2 mL	100 µL
3	3 mL	150 µL
4	4 mL	200 µL
5	5 mL	250 µL
6	6 mL	300 µL
7	7 mL	350 µL
8	8 mL	400 µL
9	9 mL	450 µL
10	10 mL	500 µL
11	11 mL	550 µL
12	12 mL	600 µL

Note: cette solution de travail des anticorps de détection doit être préparée fraîchement juste avant la réalisation de l'essai.

- Enlever l'adhésif pour plaque. Aspirer le contenu de chaque puits. Bien laver 5 fois en distribuant 350 µL de solution de lavage de travail dans chaque puits et aspirer ensuite complètement le contenu. Ou bien utiliser un laveur de plaques de microtitration automatique.
- Ajouter 100 µL de la solution de travail des anticorps de détection dilués à chacun des puits.
- Couvrir la plaque avec l'adhésif pour plaque et incuber sur un agitateur orbital (170 tpm) à température ambiante pendant 1 heure.
- Enlever l'adhésif pour plaque. Aspirer le contenu de chaque puits. Bien laver 5 fois en distribuant 350 µL de solution de lavage de travail dans chaque puits et aspirer ensuite complètement le contenu. Ou bien utiliser un laveur de plaques de microtitration automatique.
- Ajouter 100 µL de solution de substrat TMB dans chacun des puits.
- Couvrir la plaque avec un adhésif pour plaque plus une feuille d'aluminium pour éviter l'exposition à la lumière.
- Incuber la plaque à température ambiante pendant 20 minutes.
- Enlever la feuille d'aluminium et l'adhésif pour plaque. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt dans chacun des puits. Mélanger doucement.
- Lire l'absorbance à 450 nm dans les 10 minutes dans un lecteur de plaques de microtitration.

Note: afin de réduire le bruit de fond, on peut régler l'appareil pour une mesure en double à 450 nm avec une correction de longueur d'onde de bruit de fond réglée à 595 nm, 620 nm ou 630 nm.

NOTES DE PROCÉDURE

- Il est recommandé d'analyser en double tous les calibrateurs, contrôles et échantillons inconnus. Il faut utiliser la moyenne des absorbances lues de chacun des doubles pour la réduction des données et le calcul des résultats.
- Conservé les réactifs sensibles à la lumière dans leurs flacons bruns d'origine.
- Conservé toutes les barrettes tapissées d'anticorps non utilisées dans le sachet d'aluminium refermable Ziploc avec un dessiccateur pour les protéger de l'humidité.
- Une technique soigneuse et une utilisation de dispositifs de pipetage correctement calibrés sont nécessaires pour assurer la reproductibilité de l'analyse.
- Des temps d'incubation ou des températures différentes de celles prescrites dans l'encart peuvent affecter les résultats.
- Éviter les bulles d'air dans les puits de microtitration car elles peuvent diminuer l'efficacité de la liaison et augmenter le % du CV de la lecture en double.
- Tous les réactifs doivent être mélangés doucement et à fond avant d'être utilisés. Éviter la formation de mousse.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

- Calculer l'absorbance moyenne pour chaque paire de résultats des analyses en double.
- Soustraire l'absorbance moyenne du CAL 0 (0 ng/mL) de l'absorbance moyenne de toutes les lectures pour obtenir l'absorbance corrigée.
- La courbe de calibration est générée en portant sur un papier millimétré ou log-log l'absorbance corrigée de tous les calibrateurs en ordonnée en fonction de leur concentration en abscisse. Des programmes adaptés de réduction de données assistée par ordinateur peuvent également être utilisés pour calculer les résultats.

Les concentrations en chromogranine A humaine des contrôles et des échantillons de patients sont lues directement à partir de la courbe de calibration en utilisant leur absorbance corrigée respective.

PROTOCOLAGE DES RÉSULTATS

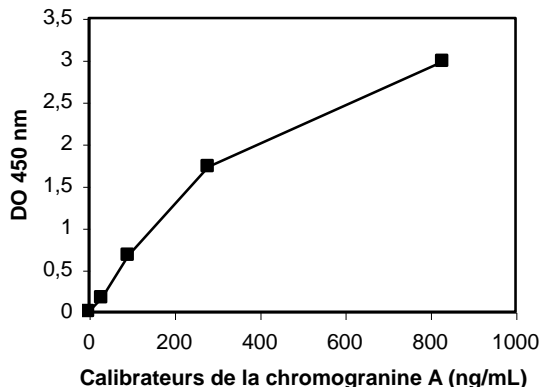
Le laboratoire devrait protocoler les résultats directs de l'analyse. Pour les échantillons montrant des valeurs élevées, il est fortement recommandé de diluer l'échantillon du patient à 1:100 avec le tampon d'incubation et de réanalyser l'échantillon dilué pour obtenir un résultat d'analyse plus précis. Si l'échantillon dilué à 1:100 continue à montrer une valeur supérieure à celle du calibrateur le plus élevé, l'on peut soit protocoler la valeur de l'échantillon comme étant supérieure au calibrateur le plus élevé (par ex. > 56.000 ng/mL) soit refaire une mesure sur un échantillon dilué à 1:10.000.

EXEMPLE DE DONNÉES ET DE COURBE DE CALIBRATION

Le tableau ci-dessous reprend des données typiques d'absorbance et la courbe de calibration résultante pour un ELISA de la chromogranine A humaine. **Cette courbe ne doit jamais être utilisée à la place de la courbe de calibration calculée en temps réel.**

I.D. des Puits	Absorbance à 450 nm DO			Résultats ng/mL
	Lectures	Moyenne	Corrigée	
0 ng/mL	0,078 0,074	0,076	0,000	
31 ng/mL	0,242 0,239	0,240	0,164	
93 ng/mL	0,757 0,740	0,748	0,672	
280 ng/mL	1,840 1,763	1,802	1,726	
830 ng/mL	3,139 2,980	3,059	2,983	
Contrôle 1	0,444 0,451	0,447	0,371	56,27 ng/mL
Contrôle 2	1,300 1,252	1,276	1,200	186,70 ng/mL

ELISA chromogranine A humaine



VALEURS ATTENDUES

Le sérum de septante-deux adultes normaux a été analysé avec cet ELISA pour la chromogranine A humaine. Les valeurs normales étaient en dessous de 100 ng/mL. Cinq patients souffrant d'un phéochromocytome montraient un taux en chromogranine A supérieur à 100 ng/mL et l'un d'eux atteignait 330.000 ng/mL. Il est fortement recommandé que chaque laboratoire établisse son propre taux limite normal.

Bien qu'un taux sérique en chromogranine A supérieur à 100 ng/mL soit une aide au diagnostic clinique, il est recommandé d'établir un taux de base de chromogranine A pour chaque patient qui sera suivi après la chirurgie pour un cancer. Une montée évidente du taux en chromogranine A indiquerait une augmentation de l'activité des cellules cancéreuses.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Aucun calibrateur "d'or" n'étant disponible pour la mesure de la chromogranine A humaine, les valeurs des calibrateurs ont été établies par corrélation avec un calibrateur de la chromogranine A hautement purifié.
- Si la valeur d'un échantillon est plus élevée que le calibrateur le plus élevé, il est recommandé de refaire la mesure sur un échantillon dilué.
- Une contamination bactérienne ou fongique des échantillons de sérum ou des réactifs ou une contamination croisée entre les réactifs peuvent provoquer des résultats erronés.
- L'eau désionisée sur des résines polyester peut inactiver l'enzyme peroxydase de raifort.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Afin d'assurer la validité des résultats, chaque essai doit inclure les contrôles adéquats avec des taux en chromogranine A connus. Nous recommandons d'inclure dans tous les essais des contrôles de chromogranine A propres au laboratoire, en plus de ceux fournis dans la trousse.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité

La sensibilité de l'ELISA Chromogranine A humaine déterminée par un intervalle de confiance à 95% sur 20 déterminations en double du calibrateur zéro est approximativement de 5 ng/mL.

Effet "crochet" à haute concentration

Cet essai ne présente pas d'effet crochet à haute concentration jusqu'à 1.000.000 ng/mL. C'est important car certains patients avec un phéochromocytome ont des taux sériques en chromogranine A qui dépassent 300.000 ng/mL.

Précision

La précision intra-essai a été validée en mesurant 20 fois deux échantillons de contrôle dans un même essai.

Valeur moyenne de la chromogranine A (ng/mL)	CV (%)
63,5	4,2
209	3,6

La précision inter-essai a été validée en mesurant en double deux échantillons de contrôle dans 12 essais différents.

Valeur moyenne de la chromogranine A (ng/mL)	CV (%)
61,9	6,7
213,3	5,6

Linéarité

Deux échantillons de sérum humain ont été dilués avec le tampon d'incubation et ont ensuite été analysés. Les résultats exprimés en ng/mL sont les suivants:

#	DILUTION	VALEUR MESURÉE	VALEUR ATTENDUE	% RÉCUPÉRATION
1	Non-dilué	286	-	-
	1:2	138	143	96
	1:4	75	72	104
	1:8	37,9	36	105
	1:16	19,5	18	108
2	Non-dilué	61,8	-	-
	1:2	32,1	30,9	104
	1:4	15,9	15,5	103
	1:8	7,2	7,7	94

Épreuve de surcharge

L'on a ajouté, à deux échantillons de patients, différentes quantités de chromogranine A humaine (1 vol. + 1 vol. de mélange) et on les a ensuite dosés. Les résultats exprimés en ng/mL sont les suivants:

#	Valeur orig.	Quantité ajoutée	Valeur mesurée	Valeur attendue	% Récupération
1	62,8	31	45,2	46,9	96
		93	75,6	77,9	97
		280	152,8	171,4	89
2	289	31	152,2	160	95
		93	176	191	92
		280	288,2	284,5	101

Bibliographie

1. Pirker RA, Pont J, Pöhl R, Schütz W, Griesmacher A, Müller MM. Usefulness of chromogranin A as a marker for detection of relapses of carcinoid tumours. Clin Chem Lab Med 1998;36:837-40.
2. Kimura N, Miura W, Noshiro T, Mizunashi K, Hanew K, Shimizu K, et al. Plasma chromogranin A in pheochromocytoma, primary hyperparathyroidism and pituitary adenoma in comparison with catecholamine, parathyroid hormone and pituitary hormones. Endocr J 1997;44:319-27.
3. Hendy GN, Bevan S, Mattei MG, Moulard AJ. Chromogranin A. Clin Invest Med 1995;18:47-65.
4. Deftos LJ. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. Endocrine Reviews: 1991;12:181-7
5. Sobol RE, Memoli V, Deftos LJ. Hormone-negative, chromogranin A-positive endocrine tumors. N Engl J Med 1989;320:444-7.

Résumé du protocole:

1. Ajouter 25 µL des calibrateurs, contrôles et échantillons de patient dans les puits de microtitration désignés
 2. Ajouter 100 µL de tampon d'incubation à chacun des puits.
 3. Mélanger, couvrir et incuber la plaque à température ambiante et agiter (170 tpm) pendant 2 heures.
 4. Laver tous les puits 5 fois.
 5. Ajouter 100 µL d'anticorps de détection dilués à chaque puits.
 6. Incuber 1 heure à température ambiante et agiter (170 tpm).
 7. Laver tous les puits 5 fois.
 8. Ajouter 100 µL de solution de substrat TMB dans chacun des puits.
 9. Couvrir et incuber la plaque à température ambiante pendant 20 minutes.
 10. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt dans chacun des puits
 11. Lire l'absorbance à 450 nm
-

Date de révision: 2016-07-27



Human Chromogranin A ELISA Kit

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) zur Messung von Human Chromogranin A Spiegeln in Serum

KAPEPKT812

IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

VORGESEHENER GEBRAUCH

Dieser ELISA Kit (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) dient zur quantitativen Bestimmung von humanen Chromogranin A Spiegeln aus Patientenserum. Dieser Test mißt ausschließlich humanes Chromogranin A ohne Hochdosis- "Hook" – Effekt bis zu 1.000.000 ng/ml. Der Test kann als Hilfe beim Auffinden von Phäochromocytom und neuroendokrinen Patiententumoren dienen.

ZUSAMMENFASSUNG DER PHYSIOLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN

Chromogranin A ist ein saures Protein von 49 kDa, das aus 439 Aminosäuren, die auf dem Chromosom 14 codiert sind, besteht. Chromogranin A wurde auf einer Anzahl von normalen und neoplastischen Geweben identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter zirkulierender Chromogranin A Spiegel ein Marker für Tumore neuroendokrinen Ursprungs sein könnte. Die signifikanteste klinische Anwendung von Chromogranin A ist die diagnostische Prozedur bei Patienten mit Phäochromocytom. Nachfolgend sind mögliche Anwendungen von Chromogranin A aufgelistet.

1. Es ist ein sehr sensibler (83%) und hochspezifischer (96%) Marker bei der Evaluierung von akutem oder vermutetem Phäochromocytom. Medikamente, die normalerweise bei der Diagnose oder Behandlung des Phäochromocytoms eingesetzt werden haben nur geringen Einfluß auf den Plasmaspiegel von Chromogranin A. Das bedeutet einen großen Vorteil der Chromogranin A Bestimmung gegenüber der Benutzung von Catecholaminen.
2. Um den Ursprung eines Tumors zu ermitteln. Ein hoher Chromogranin A Spiegel deutet darauf hin, dass der Tumor neuroendokrinen Geweben entstammt.
3. Endokrine Tumore, die nicht ihre spezifischen Hormone erzeugen, z.B. Calcitonin negative, aber Chromogranin A positive C-Zell Karzinome; Zero-Zell Karzinome; Beta-Zell Karzinome; Parathyroid Karzinome.

TESTPRINZIP

Dieser ELISA ist konzipiert, entwickelt und produziert zur quantitativen Messung von humanem Chromogranin A in Serum Proben. Der Test verwendet die Doppelbindung „Sandwich“-Technik mit zwei ausgewählten Antikörpern, die an verschiedene Epitope des humanen Chromogranins binden.

Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben werden direkt in die Vertiefungen einer mit polyklonalem Anti-Chromogranin A Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte gegeben. Nach der ersten Inkubationsperiode fängt der an den Vertiefungen fixierte Antikörper das humane Chromogranin A aus der Probe. Zurückbleibende, ungebundene Proteine werden ausgewaschen. Danach wird ein mit Merrettichperoxidase (HRP) markierter monoklonaler Anti-human Chromogranin A Antikörper in jede Vertiefung gegeben und ein „Sandwich“ aus „monoklonalem Antikörper – humanem Chromogranin A – polyklonalem Antikörper“ geformt. Der ungebundene monoklonale Antikörper wird im nachfolgenden Waschschritt entfernt. Die Vertiefung wird mit einer Substratlösung in einem zeitlich festgelegten Intervall inkubiert, die Reaktion wird gestoppt und die Färbung in einem spektrometrischen Mikrotiterplattenleser gemessen. Die enzymatische Aktivität des an die Wand der Vertiefung gebundenen Immunkomplexes ist direkt proportional zum Gehalt an Chromogranin A in der Probe. Es wird eine Kalibrationskurve, durch Auftragen der Absorption gegen die human Chromogranin A –Konzentration jedes Kalibrators als Punkt zu Punkt, oder kubische Skalierung, oder 4 Parameter Kurve, erstellt. Die Konzentration von Chromogranin A der Proben wird direkt aus der Kalibrationskurve abgelesen.

REAGENZEN: Herstellung und Lagerung

Dieser Testkit muß nach Lieferung bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum des Kits befindet sich auf dem Etikett der Testverpackung. Alle Komponenten sind bis zum Verfallsdatum stabil.

Vor dem Gebrauch müssen die alle Reagenzien Raumtemperatur erreichen. Reagenzien mit verschiedenen Lotnummern sollten nicht kombiniert oder ausgetauscht werden.

1. Anti-CgA Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte

Eine Mikrotiterplatte mit 12x8 Streifen (96 Vertiefungen total), beschichtet mit Antikörper gegen humanes Chromogranin A. Die Platte enthält einen Rahmen und ist in einem Ziploc Folienbeutel mit einem Trockenmittel versiegelt. Dieses Reagenz sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden und ist bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett der Testverpackung haltbar.

2. | | | | |----|-----|------| | Ab | HRP | CONC | |----|-----|------| Detektierender Antikörper

Ein Fläschchen mit 0,6 ml HRP markiertem Anti-human Chromogranin A Antikörper in einer stabilisierten Proteinmatrix. Dieses Reagenz muß vor der Verwendung mit Verdünnungspuffer verdünnt werden. Dieses Reagenz sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden und ist bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett der Testverpackung haltbar.

3. | | | |-----|-----| | DIL | BUF | |-----|-----| Verdünnungspuffer

Ein Fläschchen mit 12 ml gebrauchsfertigem Puffer. Er sollte ausschließlich zur Verdünnung des detektierenden Antikörpers, entsprechend der Testprozedur verwendet werden. Dieses Reagenz sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden und ist bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett der Testverpackung haltbar.

4. | | | |-----|-----| | INC | BUF | |-----|-----| Inkubationspuffer

Eine Flasche mit 30 ml gebrauchsfertigem, phosphatgepufferten, salzbasierenden Inkubationspuffer mit Rinderserumalbumin. Dieses Reagenz sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden und ist bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett der Testverpackung haltbar.

5. | | | | |------|------|------| | WASH | SOLN | CONC | |------|------|------| Waschpuffer

Eine Flasche mit 30 ml eines 30-fach Konzentrats. Vor Gebrauch muß der Inhalt mit 870 ml aqua dest. verdünnt und gut gemischt werden. Durch die Verdünnung wird eine gebrauchsfertige Waschlösung mit Tensiden in phosphatgepuffertes Salzlösung und einem Non-Azid Konservierungsmittel hergestellt. Die verdünnte Lösung sollte bei Raumtemperatur gelagert werden und ist bis zum Verfallsdatum des Kits auf dem Verpackungsetikett stabil.

6. | | | |-------|-----| | CHROM | TMB | |-------|-----| TMB-Substratlösung

Eine Flasche mit 12 ml Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid. Dieses Reagenz sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden und ist bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett der Testverpackung haltbar.

7. | | | |------|------| | STOP | SOLN | |------|------| Stopplösung

Eine Flasche mit 12 ml 0,5 M Schwefelsäure. Dieses Reagenz sollte bei 2-8°C oder Raumtemperatur aufbewahrt werden und ist bis zum Verfallsdatum auf dem Verpackungsetikett haltbar.

8. | | | |-----|---| | CAL | N | |-----|---| Kalibratoren 0-4

Fünf Fläschchen, jedes enthält humanes Chromogranin A in einer lyophilisierten Rinderserummatrix und ein Non-Azid Konservierungsmittel. **Die exakte Konzentration jedes Kalibrators entnehmen Sie dem jeweiligen Etikett.** Diese Reagenzien sollten bei 2-8°C aufbewahrt werden und sind bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett der Testverpackung haltbar.

9. | | | |---------|---| | CONTROL | N | |---------|---| Kontrollen 1-2

Zwei Fläschchen, jedes enthält humanes Chromogranin A in einer lyophilisierten Rinderserummatrix und ein Non-Azid Konservierungsmittel. **Die exakte Konzentration jeder Kontrolle entnehmen Sie dem jeweiligen Etikett.** Beide Kontrollen sollten bei 2-8°C aufbewahrt werden und sind bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett der Testverpackung haltbar.

SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

Zum in vitro Gebrauch

Das Ausgangsmaterial für Reagenzien die Rinderserum enthalten wurde in 48 zusammenhängenden US-Staaten gewonnen. Es wurde ausschließlich von gesunden Spendertieren unter Veterinärüberwachung gewonnen und ist frei von ansteckenden Krankheiten. Tragen Sie Handschuhe bei der Testdurchführung und behandeln Sie die Reagenzien als ob sie potentiell infektiös seien. Vermeiden Sie den Kontakt mit Reagenzien die TMB, Wasserstoffperoxid oder Schwefelsäure enthalten. TMB kann Irritationen an der Haut und mucösen

Membranen hervorrufen und verursacht allergische Hautreaktionen. TMB steht unter dem Verdacht kanzerogen zu sein. Schwefelsäure kann schwere Irritationen beim Hautkontakt hervorrufen. Nicht in die Augen, auf die Haut, oder die Kleidung gelangen lassen. Nicht in den Körper aufnehmen oder die Dämpfe einatmen. Bei Kontakt mit reichlich Wasser für mindestens 15 Minuten spülen. Halten Sie sich an die GLP-Regeln (Good Laboratory Practice)

ERFORDERLICHE NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN

1. Präzisions-Einkanalpipetten für 10µl, 50µl, 100µl und 1000µl, etc..
2. Mehrfachdispenser für 100µl
3. Einmalpipettenspitzen für die oben genannten Volumina
4. Einmal-Glasröhrchen 12x75 mm oder 13x 100 mm
5. Einmal-Plastikflaschen mit 100ml und 1000 ml, mit Verschlusskappen
6. Aluminiumfolie
7. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
8. Plastikabdeckung oder Polyäthylenfilm für Mikrotiterplatten
9. ELISA Mehrkanal-Waschflasche oder automatisches (halbautomatisches) Waschsysteem
10. Spektralphotometrischer Mikrotiterplattenleser geeignet für Absorptionsmessungen bei 450nm

PROBENNAHME

Es werden nur 50µl humanes Serum für die Chromogranin A Messung im doppelten Ansatz benötigt. Es ist keine spezielle Vorbereitung des Patienten vor der Probennahme nötig. Es sollte Vollblut entnommen werden und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur koagulieren, bevor das Serum durch Zentrifugation (850-1500 xg für 10 Minuten) separiert wird. Das Serum sollte innerhalb von 3 Stunden nach der Entnahme vom Blutkuchen getrennt und in ein sauberes Teströhrchen überführt werden. Serumproben sollten bei -20°C oder niedriger bis zur Messung aufbewahrt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben (mehr als drei Zyklen).

TESTDURCHFÜHRUNG

1. Reagenzien Vorbereitung

- (1) Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur. Reagenzien verschiedener Chargen sollten nicht kombiniert oder ausgetauscht werden.
- (2) Der Waschpuffer muß vor Benutzung auf Gebrauchsstärke verdünnt werden. Bitte beachten Sie hierzu den Abschnitt REAGENZIEN.
- (3) Rekonstituieren Sie alle Testkalibratoren und Kontrollen durch Zugabe von **0,5 ml** demineralisiertem Wasser zu jedem Röhrchen. Gestatten Sie den Kalibratoren und Kontrollen 10 Minuten ungestörtes Rekonstituieren, danach gut durchmischen durch Umkehrung oder sanftes Vortexen. Es muß sichergestellt werden, dass alle festen Bestandteile vor der Benutzung vollständig gelöst sind. Die rekonstituierten Kalibratoren und Kontrollen müssen bei wenigstens -20°C gelagert werden. Überschreiten Sie dabei nicht 3 Einfrier- und Auftauzyklen.

2. Testprozedur

- (1) Plazieren Sie eine ausreichende Anzahl Antikörper beschichtete Mikrostreifen in eine Halterung, um die Kalibratoren, Kontrollen und unbekanntes Proben im Duplikat zu testen.
- (2) Testkonfiguration

REIHE	STREIFEN 1	STREIFEN 2	STREIFEN 3
A	KAL 0	KAL 4	PROBE 2
B	KAL 0	KAL 4	PROBE 2
C	KAL 1	C 1	PROBE 3
D	KAL 1	C 1	PROBE 3
E	KAL 2	C 2	PROBE 4
F	KAL 2	C 2	PROBE 4
G	KAL 3	PROBE 1	
H	KAL 3	PROBE 1	

- (3) Fügen Sie 25µl der Kalibratoren, Kontrollen und Patienteproben in die vorbestimmten Vertiefungen.
- (4) Geben Sie 100µl Inkubationspuffer in jede Vertiefung.
- (5) Versiegeln Sie die Platte und inkubieren Sie sie unter kreisförmigem Schütteln (170 upm) für 2 Stunden bei Raumtemperatur.
- (6) Bereiten Sie die Antikörperdetektionslösung durch verdünnen (1:21) mit Verdünnungspuffer vor. Für jeden Streifen wird 1ml der Inkubationspuffers mit 50µl Antikörper in einem sauberen Teströhrchen oder Flaschen benötigt.

Die untenstehende Tabelle zeigt die für jeden Streifen benötigte Menge Antikörperarbeitslösung .

Streifen Nr.	Verdünnungspuffer	Detektierender Antikörper
1	1 mL	50 µL
2	2 mL	100 µL
3	3 mL	150 µL
4	4 mL	200 µL
5	5 mL	250 µL
6	6 mL	300 µL
7	7 mL	350 µL
8	8 mL	400 µL
9	9 mL	450 µL
10	10 mL	500 µL
11	11 mL	550 µL
12	12 mL	600 µL

Achtung: Die Antikörper Detektionslösung sollte direkt vor der Testdurchführung frisch hergestellt werden.

- (7) Entfernen Sie die Plattenversiegelung. Saugen Sie den Inhalt aus jeder Vertiefung. Waschen Sie jede Vertiefung 5 mal mit 350µl zubereiteter Waschlösung und saugen Sie danach die Inhalte komplett ab. Alternativ kann auch ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschgerät benutzt werden.
- (8) Fügen Sie 100µl der oben beschriebenen Antikörper Detektionslösung zu jeder Vertiefung
- (9) Verschließen Sie die Platte mit einer Versiegelung und inkubieren Sie sie für 1 Stunde unter kreisförmigem Schütteln (170 upm)
- (10) Entfernen Sie die Plattenversiegelung. Saugen Sie den Inhalt aus jeder Vertiefung. Waschen Sie jede Vertiefung 5 mal mit 350µl zubereiteter Waschlösung und saugen Sie danach die Inhalte komplett ab. Alternativ kann auch ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschgerät benutzt werden
- (11) Fügen Sie 100µl TMB-Substratlösung in jede Vertiefung.
- (12) Verschließen Sie die Platte mit einer Versiegelung und zusätzlich mit einer Aluminiumfolie, um Lichtexposition zu vermeiden.
- (13) Inkubieren Sie die Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur.
- (14) Entfernen Sie die Aluminiumfolie und die Plattenversiegelung. Fügen Sie 100µl Stopplösung in jede Vertiefung. Mischen Sie vorsichtig durch.
- (15) Lesen Sie die Absorption bei 450nm innerhalb von 10 Minuten in einem Mikroplattenleser ab.

Achtung: Um den Hintergrund zu reduzieren, kann das Instrument auf duale Ablesung bei 450 nm, mit den Hintergrundwellenlängen 595nm, 620nm oder 630nm, eingestellt werden.

ANMERKUNGEN ZUR DURCHFÜHRUNG

1. Es ist notwendig, dass alle Kalibratoren, Kontrollen und unbekanntes Proben im Doppelansatz getestet werden. Der Mittelwert jedes Doppelpaares sollte zur Datenreduktion und zur Ergebniskalkulation benutzt werden.
2. Bewahren Sie lichtempfindliche Reagenzien in den braunen Originalgefäßen auf.
3. Bewahren Sie jeden unbenutzten, mit Antikörper beschichteten Streifen in einem Ziploc Beutel mit Trockenmittel auf, um ihn vor Feuchtigkeit zu schützen.
4. Eine sorgfältige Technik und der Gebrauch von genau kalibrierten Pipetten sind notwendig, um die Reproduzierbarkeit des Tests abzusichern.
5. Gegenüber dieser Anleitung geänderte Inkubationszeiten oder -temperaturen können die Ergebnisse beeinflussen.
6. Vermeiden Sie Luftblasen in den Vertiefungen, dies kann zu einer herabgesetzten Bindungseffektivität und einem höheren CV% bei doppelter Ablesung führen.
7. Alle Reagenzien sollten sanft und sorgfältig vor der Benutzung gemischt werden. Vermeiden Sie Schaumbildung.

ERGEBNISINTERPRETATION

1. Berechnen Sie die durchschnittliche Absorption für jedes Test-Duplikatergebnis.
2. Subtrahieren Sie die Durchschnittsabsorption des Kalibrators 0 (0 ng/ml) von der Durchschnittsabsorption der anderen Ablesungen, um die korrekte Absorption zu erhalten.
3. Die Kalibrationskurve wird mit den korrigierten Absorptionswerten aller Kalibratoren auf der Ordinate gegen die Kalibratorkonzentrationen auf der Abszisse als Punkt zu Punkt oder log zu log erstellt.

Die human Chromogranin A Konzentrationen werden für die Kontrollen und die Patienteproben direkt aus der Kalibrationskurve abgelesen, indem die korrigierten Absorptionen benutzt werden.

MELDUNG DER TESTERGEBNISSE

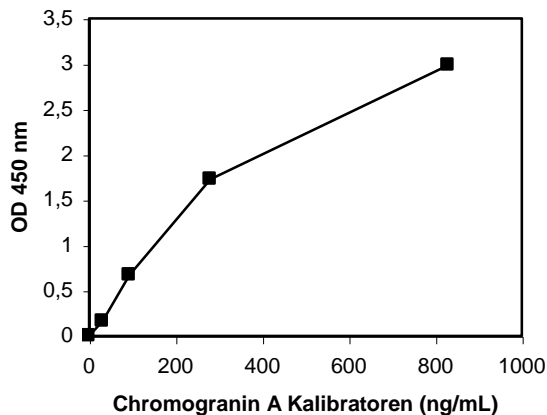
Das Labor sollte nur Testresultate, die direkt vom Test stammen, berichten. Für Proben, die höhere Werte als den 90% -Wert des höchsten Teststandards aufweisen, wird eine 1:100 Verdünnung der Patientenprobe mit Inkubationspuffer gefordert, ebenso ein erneuter Test mit der verdünnten Probe, um exaktere Ergebnisse zu erzielen. Zum Beispiel: der höchste Teststandard betrage 556 ng/ml, dann sollten alle Proben, die einen Wert, der größer als 500 ng/ml (90% von 556ng/ml) aufweist, mit einer 1:100 Verdünnung wiederholt werden. Zeigt die 1:100 verdünnte Probe immer noch einen höheren Wert als den des höchsten Standards, dann kann das Ergebnis entweder als „höher als der höchste Standard (z.B. >56.000 ng/ml)“ berichtet werden, oder es werden Messungen mit einer 1:10.000 verdünnten Probe wiederholt.

BEISPIELDATEN UND KALIBRATIONSKURVE

Typische Absorptionsdaten und die daraus resultierende Kalibrationskurve des human Chromogranin A ELISA sind unten dargestellt. Die Kurve unten sollte niemals anstelle einer Echtzeit -Kalibrationskurve benutzt werden.

Vertiefung I.D.	Absorption bei OD 450 nm			Resultate ng/ml
	Ableseung	Durchschnitt	Korrigiert	
0 ng/mL	0,078 0,074	0,076	0,000	
31 ng/mL	0,242 0,239	0,240	0,164	
93 ng/mL	0,757 0,740	0,748	0,672	
280 ng/mL	1,840 1,763	1,802	1,726	
830 ng/mL	3,139 2,980	3,059	2,983	
Kontrolle 1	0,444 0,451	0,447	0,371	56,27 ng/mL
Kontrolle 2	1,300 1,252	1,276	1,200	186,70 ng/mL

Human Chromogranin A ELISA



ERWARTETE WERTE

Zweiundsiebzig normale Erwachsenenserum wurden mit diesem human Chromogranin A ELISA gemessen. Die Normalwerte waren unter 100 ng/ml. Fünf Patienten mit Phäochromocytom zeigten einen Chromogranin A Spiegel über 100 ng/ml, einer erreichte 330.000 ng/ml. Es wird gefordert, dass jedes Labor seinen eigenen Normalwert erstellt.

Obwohl ein Serumwert des Chromogranin A, der größer als 100 ng/ml ist eine Hilfe bei der klinischen Diagnose darstellt, wird gefordert, dass ein Chromogranin A Basiswert für jeden Patienten zum Monitoring der Krebspatienten nach Operation etabliert wird. Ein klarer Anstieg des Chromogranin A Spiegels würde auf eine angestiegene Krebszellaktivität hindeuten.

GRENZEN DER TESTPROZEDUR

1. Weil keine Gold Standard Konzentration für Chromogranin A Messungen verfügbar ist, werden die Werte der Testkalibratoren durch Korrelation gegen einen hochgereinigten Chromogranin A Kalibrator ermittelt.
2. Wenn das Ergebnis der Probe höher als das des höchsten Kalibrators ist, muß eine stärker verdünnte Probe gemessen werden.
3. Kontamination der Serumproben oder Reagenzien durch Bakterien oder Pilze, oder die Kreuzkontamination von Reagenzien kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
4. Deionisiertes Wasser mit Polyesterückständen kann das Merrettichperoxidaseenzym inaktivieren.

QUALITÄTSKONTROLLE

Um die Validität der Resultate abzusichern, sollte jeder Test geeignete Kontrollen mit bekannten Chromogranin A Spiegeln enthalten. Wir fordern, dass zusätzlich zu allen Tests mit laboreigenen Chromogranin A Kontrollen auch die im Testkit enthaltenen mitgeführt werden.

GEBRAUCHSEIGENSCHAFTEN

Sensitivität

Die Sensitivität des human Chromogranin A ELISA beträgt 5 ng/ml, wie sie durch das Vertrauenslimit 95% an 20 Doppelbestimmungen des Null-Kalibrators bestätigt wurde.

Hochdosis „hook“-Effekt

Dieser Test hat gezeigt, dass er keinen Hochdosis „Hook“-Effekt bis zu einer Konzentration von 1.000.000 ng/ml aufweist. Dieses ist wichtig, da einige Patienten mit Phäochromocytom über 300.000 ng/ml Chromogranin A Spiegel in ihren Serumproben aufwiesen.

Präzision

Die Intra-Assay-Präzision wird durch die Messung von zwei Kontrollproben in einem Testansatz mit 20 wiederholten Messungen validiert.

Durchschnittswert Chromogranin A (ng/ml)	CV (%)
63,5	4,2
209	3,6

Die Inter-Assay-Präzision wird durch die Messung von zwei Kontrollproben als Duplikat in 12 individuellen Testpackungen validiert.

Durchschnittswert Chromogranin A (ng/ml)	CV (%)
61,9	6,7
213,3	5,6

Linearität

Zwei humane Serumproben wurden mit Inkubationspuffer verdünnt und getestet. Die in ng/ml ausgedrückten Ergebnisse waren wie folgt:

#	VERDÜNNUNG	Beobachtete WERTE	ERWARTETE WERTE	Rück-gewinnung %
1	unverdünnt	286	-	-
	1:2	138	143	96
	1:4	75	72	104
	1:8	37,9	36	105
	1:16	19,5	18	108
2	unverdünnt	61,8	-	-
	1:2	32,1	30,9	104
	1:4	15,9	15,5	103
	1:8	7,2	7,7	94

Wiederfindung

Zwei Patienten Serumproben wurden mit verschiedenen festgelegten Mengen humanem Chromogranin A (1+1 Volumenmischung) versetzt und getestet. Die in ng/ml ausgedrückten Ergebnisse waren wie folgt:

#Nr.	Original Wert	Festgelegte Menge	Beobachteter Wert	Erwarteter Wert	Rückgewinnung %
1	62,8	31	45,2	46,9	96
		93	75,6	77,9	97
		280	152,8	171,4	89
2	289	31	152,2	160	95
		93	176	191	92
		280	288,2	284,5	101

Literatur

1. Pirker RA, Pont J, Pöhl R, Schütz W, Griesmacher A, Müller MM. Usefulness of chromogranin A as a marker for detection of relapses of carcinoid tumours. Clin Chem Lab Med 1998;36:837-40.
2. Kimura N, Miura W, Noshiro T, Mizunashi K, Hanew K, Shimizu K, et al. Plasma chromogranin A in pheochromocytoma, primary hyperparathyroidism and pituitary adenoma in comparison with catecholamine, parathyroid hormone and pituitary hormones. Endocr J 1997;44:319-27.
3. Hendy GN, Bevan S, Mattei MG, Moulard AJ. Chromogranin A. Clin Invest Med 1995;18:47-65.
4. Deftos LJ. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. Endocrine Reviews: 1991;12:181-7
5. Sobol RE, Memoli V, Deftos LJ. Hormone-negative, chromogranin A-positive endocrine tumors. N Engl J Med 1989;320:444-7.

Testkurzprozedur

1. Geben Sie 25µl der Kalibratoren, Kontrollen und Patienten Serumproben in die vorbestimmten Vertiefungen
 2. Fügen Sie 100µl Inkubationspuffer in jede Vertiefung zu
 3. Mischen Sie, decken Sie die Platte ab und inkubieren sie für 2 Stunden unter Schütteln (170 upm) bei Raumtemperatur
 4. Waschen Sie jede Vertiefung 5 mal
 5. Fügen Sie 100µl verdünnte Antikörperdetektionslösung in jede Vertiefung zu
 6. Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln (170upm)
 7. Waschen Sie jede Vertiefung 5 mal
 8. Fügen Sie 100µl TMB-Substratlösung in jede Vertiefung
 9. Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie sie 20 Minuten bei Raumtemperatur
 10. Fügen Sie 100µl Stopplösung in jede Vertiefung
 11. Bestimmen Sie die Absorption bei 450 nm.
-
-

Revisionsdatum: 2016-07-27



Kit Human Chromogranin A ELISA

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la medición de los niveles de cromogranina A humana en suero

KAPEPKT812

DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel.: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 91

INDICACIONES

Este kit de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) está concebido para la determinación cuantitativa de los niveles de cromogranina A humana en muestras séricas de pacientes. Este ensayo mide exclusivamente la cromogranina A humana sin el efecto "gancho" de las concentraciones elevadas hasta 1.000.000 ng/ml como máximo. La prueba podría servir de ayuda para detectar feocromocitoma y tumores neuroendocrinos en pacientes.

RESUMEN DE LA FISIOLÓGÍA

La cromogranina A es una proteína ácida de 49 kDa que consta de 439 aminoácidos codificados en el cromosoma 14. La cromogranina A ha sido identificada en una serie de tejidos endocrinos normales y neoplásicos. Se ha demostrado que un nivel circulante elevado de cromogranina A podría ser un marcador de tumores de origen neuroendocrino. Sin embargo, el uso clínico más importante de la cromogranina A está relacionado con el procedimiento de diagnóstico en pacientes del feocromocitoma. A continuación se indica un resumen breve del uso potencial de la cromogranina A:

1. Marcador muy sensible (83 %) y altamente específico (96 %) en la evaluación de feocromocitoma confirmado o sospechado. Los fármacos utilizados más habitualmente en el diagnóstico o tratamiento del feocromocitoma tienen poco efecto sobre el nivel plasmático de la cromogranina A. Lo que significa que es una gran ventaja medir la cromogranina A en lugar de las catecolaminas.
2. Para establecer el origen de un tumor. Un nivel de cromogranina A elevado indica que el tumor proviene de los tejidos neuroendocrinos.
3. Los tumores endocrinos que no producen sus hormonas específicas, por ejemplo, el carcinoma de células C negativo para calcitonina pero positivo para cromogranina A, el carcinoma de células cero; el carcinoma de células beta y el carcinoma paratiroideo.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este ELISA se ha diseñado, desarrollado y producido para la determinación cuantitativa de cromogranina A humana en muestras séricas. El ensayo emplea la técnica tipo "sándwich" doble con dos anticuerpos seleccionados que se unen a distintos epítomos de cromogranina A humana.

Se añaden directamente los calibradores, controles y muestras de pacientes del ensayo a los pocillos de microvaloración de una microplaca recubierta con un anticuerpo policlonal anti-cromogranina A. Después del primer período de incubación, el anticuerpo fijado a la pared del pocillo de microvaloración captura la cromogranina A humana de la muestra. El resto de proteínas no unidas en los pocillos de microvaloración se lavan. Luego, se añade un anticuerpo monoclonal anti-cromogranina A humana marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pocillo de microvaloración y se forma un "sándwich" de "anticuerpo monoclonal - cromogranina A humana - anticuerpo policlonal". El anticuerpo monoclonal no unido se elimina en el siguiente paso de lavado. Se incuba el pocillo con una solución de sustrato durante un intervalo de tiempo determinado, se detiene la reacción y se mide el color que aparece en un lector de microplacas espectrofotométrico. La actividad enzimática del inmunocomplejo unido a la cromogranina A en la pared del pocillo de microvaloración es directamente proporcional a la cantidad de cromogranina A de la muestra. Se genera una curva de calibración representando la absorbancia en función de la concentración de cromogranina A humana respectiva de cada calibrador en escalas milimetradas o cúbicas, o en una curva ajustada de 4 parámetros. La concentración de cromogranina A humana en las muestras problema se determina directamente a partir de esta curva de calibración.

REACTIVOS: Preparación y conservación

El kit de la prueba debe conservarse entre 2 y 8 °C una vez recibido. Consulte en la etiqueta de la caja la fecha de caducidad del kit. Todos los componentes son estables hasta dicha fecha de caducidad.

Deje que todos los reactivos adquieran la temperatura ambiente antes de usarlos. No deben combinarse ni intercambiarse reactivos de distintos números de lote del kit.

1.

--

Microplaca recubierta de anticuerpos anti-CgA

Una microplaca con 12 x 8 tiras (96 pocillos en total) recubierta con anticuerpo contra la cromogranina A humana. La placa está enmarcada y sellada en una bolsa de aluminio tipo Ziploc con un desecante. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C, y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

2.

Ab	HRP	CONC
----	-----	------

Anticuerpo detector

Un vial que contiene 0,6 ml de anticuerpo anti-cromogranina A humana marcado con HRP en una matriz de proteínas estabilizadas. Este reactivo debe diluirse con tampón de dilución antes de usar. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C, y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

3.

DIL	BUF
-----	-----

Tampón de dilución

Un vial que contiene 12 ml de tampón listo para usar. Solo debería utilizarse para detectar dilución de anticuerpos conforme a los procedimientos del ensayo. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C, y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

4.

INC	BUF
-----	-----

Tampón de incubación

Un frasco que contiene 30 ml de tampón de incubación a base de tampón fosfato salino con albúmina sérica bovina listo para usar. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C, y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

5.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Tampón de lavado

Un frasco que contiene 30 ml de solución concentrada 30 veces. El contenido debe diluirse con 870 ml de agua destilada y mezclarse bien antes de usar. Al diluirlo se forma una solución de lavado de trabajo que contiene un tensioactivo en tampón fosfato salino con un conservante sin azida. La solución diluida debería conservarse a temperatura ambiente y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

6.

CHROM	TMB
-------	-----

Solución de sustrato de TMB

Un frasco que contiene 12 ml de tetrametilbencidina (TMB) con peróxido de hidrógeno. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C, y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

7.

STOP	SOLN
------	------

Solución de parada

Un frasco que contiene 12 ml de ácido sulfúrico 0,5 M. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C o a temperatura ambiente y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

8.

CAL	N
-----	---

Calibradores 0 - 4

Cinco viales que contienen cada uno cromogranina A humana en una matriz de suero bovino liofilizado con un conservante sin azida. **Consulte en el vial la concentración exacta de cada calibrador.** Estos reactivos deberían conservarse entre 2 y 8 °C, y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

9.

CONTROL	N
---------	---

Controles 1 - 2

Dos viales que contienen cada uno cromogranina A humana en una matriz de suero bovino liofilizado con un conservante sin azida. **Consulte en el vial el intervalo de concentración exacto de cada control.** Ambos controles deberían conservarse entre 2 y 8 °C, y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

Para uso diagnóstico in vitro.

El material original de los reactivos de suero bovino proviene de los 48 estados limítrofes de Estados Unidos. Se obtuvo exclusivamente de animales donantes sanos mantenidos bajo control veterinario y libres de enfermedades contagiosas. Lleve guantes mientras realiza este ensayo y manipule estos reactivos como si fueran potencialmente infecciosos. Evite el contacto con reactivos que contengan TMB, peróxido de hidrógeno o ácido sulfúrico. La TMB puede causar irritación de

la piel y de las membranas mucosas, así como reacciones alérgicas cutáneas. La TMB es potencialmente carcinógena. El ácido sulfúrico puede causar irritación grave al entrar en contacto con la piel. No se salpique los ojos, la piel ni la ropa. No inhale ni inhale los vapores. Si se produce contacto, lávese con abundante agua durante 15 minutos como mínimo. Observe las Buenas Prácticas de Laboratorio.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROPORCIONADOS

- Pipetas de un solo canal que puedan dispensar 10 µl, 50 µl, 100 µl y 1000 µl, etc.
- Dispensador repetitivo adecuado para dispensar 100 µl.
- Puntas de pipeta desechables adecuadas para dispensar los volúmenes anteriores.
- Tubos de vidrio desechables de 12 x 75 mm o de 13 x 100 mm.
- Frascos de plástico desechables de 100 ml y 1000 ml con tapón.
- Papel de aluminio.
- Agua desionizada o destilada
- Tapa para pocillos de microvaloración de plástico o film de polietileno.
- Frasco de lavado multicanal de ELISA o sistema de lavado automático (semiautomático).
- Lector de microplacas espectrofotométrico con capacidad para leer la absorbancia a 450 nm.

RECOGIDA DE MUESTRAS

Solo se necesitan 50 µl de suero humano para medir la cromogranina A humana por duplicado. No es necesaria ninguna preparación especial del individuo antes de extraer la muestra. Deberá obtenerse sangre completa y dejarse coagular durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente antes de separar el suero mediante centrifugación (850 — 1500x g durante 10 minutos). El suero debe separarse del coágulo antes de tres horas desde la extracción sanguínea y transferirse a un tubo de ensayo limpio. Las muestras de suero deben conservarse a -20 °C o menos hasta medirse. Evite congelar y descongelar la muestra repetidamente (más de tres veces).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Preparación de los reactivos

- Deje que todos los reactivos adquieran la temperatura ambiente antes de usarlos. No deben combinarse ni intercambiarse reactivos de distintos números de lote del kit.
- El tampón de lavado debe diluirse con la solución de lavado de trabajo antes de usar. Véase más información en el apartado REACTIVOS.
- Reconstituya todos los calibradores y controles del ensayo añadiendo **0,5 ml** de agua desmineralizada a cada vial. Deje que los calibradores y los controles reposen durante 10 minutos y a continuación mézclelos bien invirtiéndolos o agitándolos suavemente con un vórtex. Hay que cerciorarse de que todo lo sólido se disuelva completamente antes de usar. Estos calibradores y controles reconstituidos deben conservarse a -20 °C o menos. No realice más de 3 ciclos de congelación-descongelación.

3. Procedimiento del ensayo

- Coloque un número suficiente de tiras de micropocillos recubiertas con anticuerpo en un soporte para analizar los calibradores, controles y muestras desconocidas por duplicado.
- Configuración de la prueba

FILA	TIRA 1	TIRA 2	TIRA 3
A	CAL 0	CAL 4	MUESTRA 2
B	CAL 0	CAL 4	MUESTRA 2
C	CAL 1	C 1	MUESTRA 3
D	CAL 1	C 1	MUESTRA 3
E	CAL 2	C 2	MUESTRA 4
F	CAL 2	C 2	MUESTRA 4
G	CAL 3	MUESTRA 1	
H	CAL 3	MUESTRA 1	

- Añada 25 µl de los calibradores, controles y muestras de pacientes a los pocillos designados.
- Añada 100 µl de tampón de incubación a cada pocillo.
- Tape la placa con un sellador de placas e incúbela con agitación orbital (170 rpm) a temperatura ambiente durante 2 horas.
- Prepare la solución de trabajo con el anticuerpo detector diluyendo el anticuerpo en una proporción 1:21 con el tampón de dilución. Para cada tira hace falta 1 ml de tampón de dilución con 50 µl del anticuerpo, en un tubo de ensayo o vial limpio.
La tabla siguiente muestra la cantidad de solución de trabajo del anticuerpo que se necesita para un cierto número de tiras.

N.º de tira	Tampón de dilución	Anticuerpo detector
1	1 ml	50 µl
2	2 ml	100 µl
3	3 ml	150 µl

4	4 ml	200 µl
5	5 ml	250 µl
6	6 ml	300 µl
7	7 ml	350 µl
8	8 ml	400 µl
9	9 ml	450 µl
10	10 ml	500 µl
11	11 ml	550 µl
12	12 ml	600 µl

Nota: esta solución de trabajo del anticuerpo detector debe estar recién preparada antes de realizar el ensayo.

- Retire el sellador de placas. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave cada pocillo 5 veces dispensando 350 µl de solución de lavado de trabajo en cada pocillo y luego aspire totalmente el contenido. Puede utilizarse de modo alternativo un lavador de microplacas automático.
- Añada 100 µl de la solución de trabajo con el anticuerpo detector diluido anteriormente a cada pocillo.
- Tape la placa con el sellador de placas e incúbela con agitación orbital (170 rpm) a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Retire el sellador de placas. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave cada pocillo 5 veces dispensando 350 µl de solución de lavado de trabajo en cada pocillo y luego aspire totalmente el contenido. Puede utilizarse de modo alternativo un lavador de microplacas automático.
- Añada 100 µl de solución de sustrato de TMB a cada pocillo.
- Tape la placa con un sellador de placas y papel de aluminio para evitar la exposición a la luz.
- Incube la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Retire el papel de aluminio y el sellador de placas. Añada 100 µl de solución de parada a cada pocillo. Mezcle suavemente.
- Lea la absorbancia a 450 nm antes de transcurridos 10 minutos en un lector de microplacas.

NOTA: si desea reducir el fondo, se puede configurar el instrumento para medición de longitud de onda doble a 450 nm con la corrección de la longitud de onda de fondo configurada a 595 nm o 620 nm o 630 nm.

NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

- Se recomienda analizar por duplicado todos los calibradores, controles y muestras desconocidas. Debería utilizarse la lectura del promedio de la absorbancia de cada duplicado para la reducción de datos y el cálculo de los resultados.
- Mantenga los reactivos fotosensibles en sus frascos originales de color ámbar.
- Conservar las tiras recubiertas con anticuerpo no utilizadas en la bolsa de aluminio tipo Ziploc con desecante para protegerlas de la humedad.
- Es necesario realizar la técnica con sumo cuidado y utilizar dispositivos de pipeteo calibrados para garantizar la reproducibilidad de la prueba.
- Los tiempos o temperaturas de incubación distintos a los indicados en este prospecto pueden influir en los resultados.
- Evite que se formen burbujas en el micropocillo ya que esto podría reducir la eficacia de la unión y aumentar el %CV de la lectura del duplicado.
- Todos los reactivos deberían mezclarse suavemente y por completo antes de usar. Evite que se forme espuma.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Calcule el promedio de la absorbancia de cada par de resultados de pruebas duplicadas.
- Reste el promedio de la absorbancia de CAL 0 (0 ng/ml) del promedio de todas las demás lecturas para obtener la absorbancia corregida.
- La curva de calibración se genera con la absorbancia corregida de todos los calibradores en el eje de ordenadas en función de la concentración de los calibradores en el eje de abscisas empleando papel milimetrado o logarítmico. También se pueden utilizar programas informáticos adecuados de reducción de datos para calcular los resultados.

Las concentraciones de cromogranina A humana de los controles y muestras de pacientes se leen directamente de la curva de calibración utilizando su absorbancia corregida respectiva.

COMUNICACIÓN DE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS

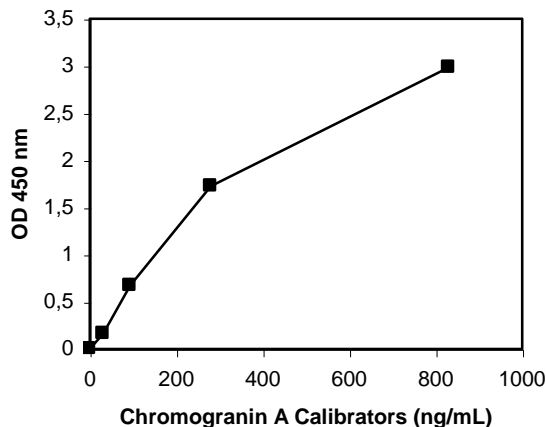
Los laboratorios deberán comunicar los resultados de las pruebas obtenidos directamente del ensayo. En el caso de muestras que arrojen valores altos, es muy recomendable diluir la muestra del paciente en una proporción 1:100 con tampón de incubación y volver a analizar la muestra diluida para obtener un resultado más exacto de la prueba. Si la muestra diluida a 1:100 sigue arrojando un valor superior al de referencia más alto del ensayo, se puede comunicar el valor como superior al de referencia más alto del ensayo (p. ej. > 56.000 ng/ml) o volver a medir una muestra diluida a 1:10.000.

EJEMPLO DE DATOS Y CURVA DE CALIBRACIÓN

A continuación se muestran datos de absorbancia típicos y la curva de calibración resultante de un ELISA de cromogranina A humana. **Esta curva no debe utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.**

ID del pocillo	DO Absorbancia a 450 nm			Resultados ng/ml
	Lecturas	Promedio	Corregida	
0 ng/ml	0,078 0,074	0,076	0,000	
31 ng/ml	0,242 0,239	0,240	0,164	
93 ng/ml	0,757 0,740	0,748	0,672	
280 ng/ml	1,840 1,763	1,802	1,726	
830 ng/ml	3,139 2,980	3,059	2,983	
Control 1	0,444 0,451	0,447	0,371	56,27 ng/ml
Control 2	1,300 1,252	1,276	1,200	186,70 ng/ml

Human Chromogranin A ELISA



VALORES ESPERADOS

Se midieron setenta y dos sueros de adultos con este ELISA para cromogranina A humana. Los valores normales fueron inferiores a 100 ng/ml. Cinco pacientes con feocromocitoma mostraron un nivel de cromogranina A superior a 100 ng/ml y uno de ellos alcanzó los 330.000 ng/ml. Es muy recomendable que cada laboratorio establezca su propio nivel de corte normal.

Aunque un nivel de cromogranina A sérica superior a 100 ng/ml sería una ayuda en el diagnóstico clínico, se recomienda establecer un nivel basal de cromogranina A para cada paciente con el fin de controlar a los pacientes de cáncer tras una intervención quirúrgica. Un aumento claro repentino del nivel de cromogranina A indicaría una mayor actividad de las células cancerígenas.

LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- Como no existe un calibrador de referencia disponible para la medida de cromogranina A humana, los valores de los calibradores se establecieron por correlación con un calibrador de cromogranina A muy purificado.
- Si el valor de una muestra es mayor que el del calibrador más alto, se recomienda medir otra muestra adicional diluida.
- Una contaminación bacteriana o fúngica de las muestras de suero o de los reactivos, o la contaminación cruzada entre reactivos podría producir resultados erróneos.
- El agua desionizada con resinas de poliéster podría inactivar la enzima de peroxidasa de rábano.

CONTROL DE CALIDAD

Para garantizar la validez de los resultados, cada ensayo debería incluir controles adecuados con niveles de cromogranina A conocidos. Recomendamos que todos los ensayos incluyan los controles de cromogranina A propios del laboratorio además de los proporcionados con este kit.

EFICACIA DIAGNÓSTICA

Sensibilidad

La sensibilidad del ELISA para cromogranina A humana, determinada por el límite de confianza del 95 % en 20 determinaciones por duplicado del calibrador cero, es de 5 ng/ml aproximadamente.

Efecto 'gancho' de las concentraciones elevadas

Este ensayo ha mostrado que no presentaba ningún efecto "gancho" de las concentraciones elevadas hasta 1.000.000 ng/ml. Esto es importante porque algunos pacientes con feocromocitoma tenían un nivel de cromogranina A de más de 300.000 ng/ml en su muestra sérica.

Precisión

La precisión intraensayo se valida midiendo dos muestras control en un solo ensayo con 20 réplicas de las determinaciones.

Valor medio de la cromogranina A (ng/ml)	CV (%)
63,5	4,2
209	3,6

La precisión interensayo se valida midiendo dos muestras control por duplicado en 12 ensayos individuales.

Valor medio de la cromogranina A (ng/ml)	CV (%)
61,9	6,7
213,3	5,6

Linealidad

Se diluyeron dos muestras séricas humanas con tampón de incubación y se analizaron. Los resultados son los siguientes expresados en ng/ml:

N.º	DILUCIÓN	VALOR OBSERVADO	VALOR ESPERADO	RECUPERACIÓN
				N.º %
1	Pura	286	-	-
	1:2	138	143	96
	1:4	75	72	104
	1:8	37,9	36	105
	1:16	19,5	18	108
2	Pura	61,8	-	-
	1:2	32,1	30,9	104
	1:4	15,9	15,5	103
	1:8	7,2	7,7	94

Recuperación

Se añadieron varias cantidades de cromogranina A humana (mezcla de 1 vol. + 1 vol.) a dos muestras séricas de pacientes y se analizaron. Los resultados son los siguientes expresados en ng/ml:

N.º	Valor orig.	Cantidad añadida	Valor observado	Valor esperado	Recuperación %
1	62,8	31	45,2	46,9	96
		93	75,6	77,9	97
		280	152,8	171,4	89
2	289	31	152,2	160	95
		93	176	191	92
		280	288,2	284,5	101

BIBLIOGRAFÍA

- Pirker RA, Pont J, Pöhl R, Schütz W, Griesmacher A, Müller MM. Usefulness of chromogranin A as a marker for detection of relapses of carcinoid tumours. Clin Chem Lab Med 1998;36:837-40.
- Kimura N, Miura W, Noshiro T, Mizunashi K, Hanew K, Shimizu K, et al. Plasma chromogranin A in pheochromocytoma, primary hyperparathyroidism and pituitary adenoma in comparison with catecholamine, parathyroid hormone and pituitary hormones. Endocr J 1997;44:319-27.

3. Hendy GN, Bevan S, Mattei MG, Mouland AJ. Chromogranin A. Clin Invest Med 1995;18:47-65.
4. Deftos LJ. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. Endocrine Reviews: 1991;12:181-7
5. Sobol RE, Memoli V, Deftos LJ. Hormone-negative, chromogranin A-positive endocrine tumors. N Engl J Med 1989;320:444-7.

Procedimiento breve del ensayo:

1. Añada 25 µl de calibradores, controles y muestras séricas de pacientes en los micropocillos designados.
 2. Añada 100 µl de tampón de incubación a cada pocillo.
 3. Mezcle, tape e incube la placa a temperatura ambiente y agite (170 rpm) durante 2 horas.
 4. Lave cada pocillo 5 veces.
 5. Añada 100 µl de anticuerpo detector diluido a cada pocillo.
 6. Incube 1 hora a temperatura ambiente y agite (170 rpm).
 7. Lave cada pocillo 5 veces.
 8. Añada 100 µl de solución de sustrato de TMB a cada pocillo.
 9. Tape e incube la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos.
 10. Añada 100 µl de solución de parada a cada pocillo.
 11. Lea la absorbancia a 450 nm.
-
-

Fecha de revisión: 2016-07-27