

Product information



Information about other products is available at: www.demeditec.com



Chromogranin A ELISA



DEE9000



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

Table of contents

1.	Introduction	6
1.1	Intended use and principle of the test	6
1.2	Clinical application	6
2.	Procedural cautions, guidelines, warnings and limitations	6
2.1	Procedural cautions, guidelines and warnings	6
2.2	Limitations	7
2.2.1	Interfering substances	7
2.2.2	Drug interferences	7
2.2.3	High-Dose-Hook effect	7
3.	Storage and stability	8
4.	Materials	8
4.1	Contents of the kit	8
4.2	Calibration and Controls	9
4.3	Additional materials required but not provided in the kit	9
4.4	Additional equipment required but not provided in the kit	9
5.	Sample collection, handling and storage	9
6.	Test procedure	9
6.1	Preparation of reagents and further notes	9
6.2	Preparation of samples – Dilution	10
6.3	Chromogranin A ELISA	10
7.	Calculation of results	10
7.1	Expected reference value	10
7.2	Typical standard curve	11
8.	Control samples	11
9.	Assay characteristics	11
9.1	Performance data	11
9.2	Metrological Traceability	12
10.	References/Literature	12
11.	Changes	13

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	14
1.1	Verwendungszweck und Testprinzip	14
1.2	Klinische Anwendung	14
2.	Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen	14
2.1	Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen	14
2.2	Grenzen des Tests	15
2.2.1	Interferenzen und sachgemäßer Umgang mit Proben	16
2.2.2	Beeinflussung durch Medikamente und Nahrungsmittel	16
2.2.3	High-Dose-Hook Effekt	16
3.	Lagerung und Haltbarkeit	16
4.	Materialien	16
4.1	Reagenzien im Kit	16
4.2	Kalibratoren und Kontrollen	17
4.3	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Materialien	17
4.4	Nicht im Kit enthaltene, aber zur Durchführung erforderliche Geräte	17
5.	Probensammlung, -behandlung und -lagerung	17
6.	Testdurchführung	17
6.1	Vorbereitung der Reagenzien und weitere Hinweise	18
6.2	Probenvorbereitung – Verdünnung	18
6.3	Chromogranin A ELISA	18
7.	Berechnung der Ergebnisse	18
7.1	Erwartete Referenzbereiche	19
7.2	Typische Standardkurve	19
8.	Kontrollproben	19
9.	Assaycharakteristika	19
9.1	Leistungsdaten	19
9.2	Metrologische Rückführbarkeit	20
10.	Referenzen/Literatur	20
11.	Änderungen	21
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS		22

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	23
1.1	A vizsgálat rendeltetése és elve	23
1.2	Klinikai alkalmazás	23
2.	Eljárási figyelmeztetések, iránymutatások, figyelmeztetések és korlátozások	23
2.1	Eljárási figyelmeztetések, iránymutatások és figyelmeztetések	23
2.2	Korlátozások	24
2.2.1	Zavaró anyagok	24
2.2.2	Gyógyszeres interferenciák	24
2.2.3	Nagy-dózisú-Hook-Effect	25
3.	Tárolás és stabilitás	25
4.	Anyagok	25
4.1	A készlet tartalma	25
4.2	Kalibrálás és ellenőrzések	26
4.3	További szükséges, de a készletben nem szereplő anyagok	27
4.4	Szükséges, de a készletben nem szereplő kiegészítő felszerelés	27
5.	Mintavétel, kezelés és tárolás	27
6.	Vizsgálati eljárás	27
6.1	Reagensek előkészítése és további megjegyzések	27
6.2	A minták előkészítése - Hígítás	27
6.3	Chromogranin A ELISA	28
7.	Az eredmények kiszámítása	28
7.1	Várható referenciaérték	28
7.2	Tipikus standard görbe	29
8.	Ellenőrző minták	29
9.	A vizsgálat jellemzői	29
9.1	Teljesítményadatok	29
9.2	Metrológiai nyomon követhetőség	30
10.	Hivatkozások/irodalom	31
11.	Változások	31

Spis treści

1.	Wprowadzenie	33
1.1	Przeznaczenie i zasada działania testu	33
1.2	Zastosowanie kliniczne	33
2.	Środki ostrożności, wytyczne, ostrzeżenia i czynniki limitujące	33
2.1	Środki ostrożności, wytyczne, ostrzeżenia	35
2.2	Czynniki limitujące	35
2.2.1	Substancje interferujące	35
2.2.2	Interferencje z lekami	35
2.2.3	Efekt wysokiej dawki (efekt „hook”)	35
3.	Przechowywanie i stabilność	36
4.	Materiały	36
4.1	Zawartość zestawu	36
4.2	Standardy i Kontrole	37
4.3	Dodatkowe materiały konieczne do wykonania oznaczenia niebędące	37
4.4	Dodatkowe wyposażenie konieczne do wykonania oznaczenia niebędące częścią składową zestawu	37
5.	Pobranie próbki i jej przechowywanie	37
6.	Procedura testu	37
6.1	Przygotowanie odczynników i dalsze uwagi	37
6.2	Przygotowanie próbek - rozcieńczanie	38
6.3	Chromogranina A ELISA	38
7.	Kalkulacja wyników	38
7.1	Oczekiwane wartości referencyjne	39
7.2	Typowa krzywa standardowa	39
8.	Kontrola jakości	39
9.	Charakterystyka testu	39
9.1	Wydajność	39
9.2	Identyfikowalność metrologiczna	40
10.	Referencje/Literatura	41
11.	Zmiany	41

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 – 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 1,200 ng/ml), hemolytic samples (up to 1 mg/ml hemoglobin), icteric samples (up to 50 mg/dl bilirubin) and lipemic samples (up to 1,700 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 – 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 -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 Contents of the kit**

BA E-0030	WASH-CONC 50x	Wash Buffer Concentrate – concentrated 50x
Content:	Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH	
Volume:	1 x 20 ml/vial, purple cap	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrate – ready to use
Content:	Chromogenic substrate containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide	
Volume:	1 x 12 ml/vial, black cap	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution – ready to use
Content:	0.25 M sulfuric acid	
Volume:	1 x 12 ml/vial, grey cap	
TM E-9010	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	
Hazard pictograms:		
	GHS07	
Signal word:	Warning	
Hazardous ingredients:	2-methyl-2H-isothiazol-3-one	
Hazard statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.	
Precautionary statements:	P280 Wear protective gloves. P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. P501 Dispose of contents/container to an authorised waste collection point.	
TM E-9013	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	
TM E-9031	96	Chromogranin A Microtiter Strips – ready to use
Content:	1 x 96 wells (12x8) goat anti-chromogranin A antibody precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant	
Description:	Species is goat	

4.2 Calibration and Controls

Standards and Controls – ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration [$\mu\text{g/l}$] CgA	Volume/Vial
TM E-9001	STANDARD A	white	0	1 ml
TM E-9002	STANDARD B	yellow	30	1 ml
TM E-9003	STANDARD C	orange	110	1 ml
TM E-9004	STANDARD D	blue	450	1 ml
TM E-9005	STANDARD E	grey	900	1 ml
TM E-9051	CONTROL 1	green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range.	1 ml
TM E-9052	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 – 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 – 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 – 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** **96** and incubate **1 h** at **RT** (20 – 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 – 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 – 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 min, 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 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. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

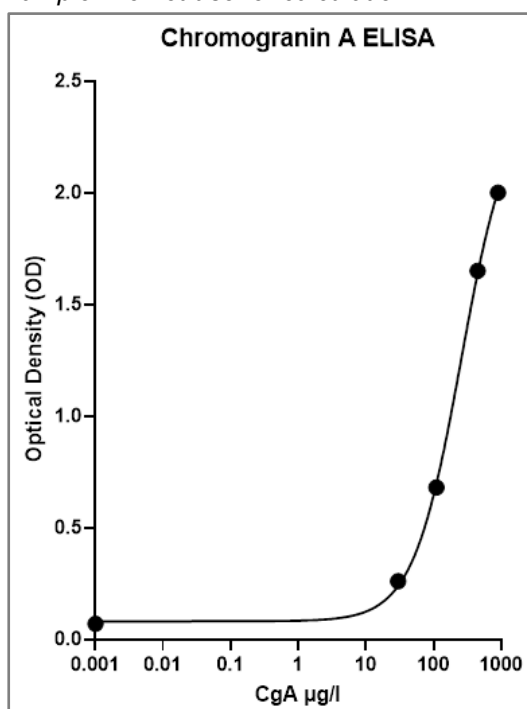
7.1 Expected reference value

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%.

10. References/Literature

- 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.
- Verbeek, W.H., C.M. Korse, and M.E. Tesselaar, *GEP-NETs UPDATE: Secreting gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours and biomarkers*. Eur J Endocrinol, 2016. **174**(1): p. R1-7.
- 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.
- Louthan, O., *Chromogranin a in physiology and oncology*. Folia Biol (Praha), 2011. **57**(5): p. 173-81.
- 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.
- 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.
- 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.

11. Changes

Version	Release Date	Chapter	Change
18.0	2021-07-09	All	– Revision of the assay due to lot-change of the matched antibody pair used – The IFU was revised according to the IVDR regulation (EU) 2017/746 – Sample Dilution changed from 1+8 to 1+20 (Chapter 6.2) – Typical pathological range was added (Chapter 7.1) – Assay characteristics changed (Chapter 9.1) – Lot-to-Lot and diagnostic performance was added to the assay characteristics – Metrological traceability was added (Chapter 9.2) – References/Literature was updated (Chapter 10)
19.0	2022-06-27	2.2.2	– Medications that can influence chromogranin level have been updated – Editorial changes
20.0	2023-03-20	7.1 9.1	– More detailed description added – Lot-to-Lot updated
21.0	2023-11-06	4.1 9.1	– Hazard labelling updated according to SDS – Recovery updated
22.0	2024-01-02	5	– Sample storage/stability adapted
23.0	2024-08-07	4.1 7	– Hazard labelling updated according to SDS – Note added to the dilution factor in the calculation

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 automatischen 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 – 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-Messung 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 1.200 ng/ml), hämolytische Proben (bis zu 1 mg/ml Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 50 mg/dl Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 1.700 mg/dl Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse. Es wird 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 Test nicht auf.

3. Lagerung und Haltbarkeit

Das Kit muss bei 2 – 8 °C bis zum Verfalldatum gelagert werden. Das Kit und die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfalldatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 2 Monate stabil, wenn sie bei 2 – 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel der ELISA-Platte sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA E-0030	WASH-CONC 50x	Waschpufferkonzentrat – 50x konzentriert
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel lila	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrat – gebrauchsfertig
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel schwarz	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stopplösung – gebrauchsfertig
Inhalt:	0,25 M Schwefelsäure	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen, Deckel grau	
TM E-9010	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	
Gefahren-piktogramme:		
	GHS07	
Signalwort:	Achtung	
Gefährliche Inhaltsstoffe:	2-Methyl-2H-isothiazol-3-on	
Gefahrenhinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.	
Sicherheitshinweise:	P280 Schutzhandschuhe tragen. P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P501 Inhalt/Behälter autorisierter Abfallsammelstelle zuführen.	

TM E-9013	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	
TM E-9031	96	Chromogranin A Mikrotiterstreifen – gebrauchsfertig
Inhalt:	1 x 96 Wells (12x8) Ziege anti-Chromogranin A Antikörper vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Beutel	
Beschreibung:	Spezies ist Ziege	

4.2 Kalibratoren und Kontrollen

Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckel-farbe	Konzentration [$\mu\text{g/l}$] CgA	Volumen/Fläschchen
TM E-9001	STANDARD A	weiß	0	1 ml
TM E-9002	STANDARD B	gelb	30	1 ml
TM E-9003	STANDARD C	orange	110	1 ml
TM E-9004	STANDARD D	blau	450	1 ml
TM E-9005	STANDARD E	grau	900	1 ml
TM E-9051	CONTROL 1	grün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Vertrauensbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.	1 ml
TM E-9052	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 – 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 – 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 durchgemischt 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 Bindung 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 – 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 – 8 °C

Chromogranin A Mikrotiterstreifen

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

- 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

- Jeweils **50 µl Standards, Kontrollen und vorverdünnte Proben** in die entsprechenden Wells der **Chromogranin A Mikrotiterstreifen** **W** **96** pipettieren und **1 h** bei **RT** (20 – 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
- 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.
- 50 µl CONJUGATE** in alle Wells pipettieren und **1 h** bei **RT** (20 – 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
- 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.
- 100 µl SUBSTRATE** in alle Wells pipettieren.
- Für **25 ± 5 Min** bei **RT** (20 – 25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
⚠ **Direktes Sonnenlicht vermeiden!**
- 100 µl STOP-SOLN** in alle Wells pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
- 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 unbekannten 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. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

7.1 Erwartete Referenzbereiche

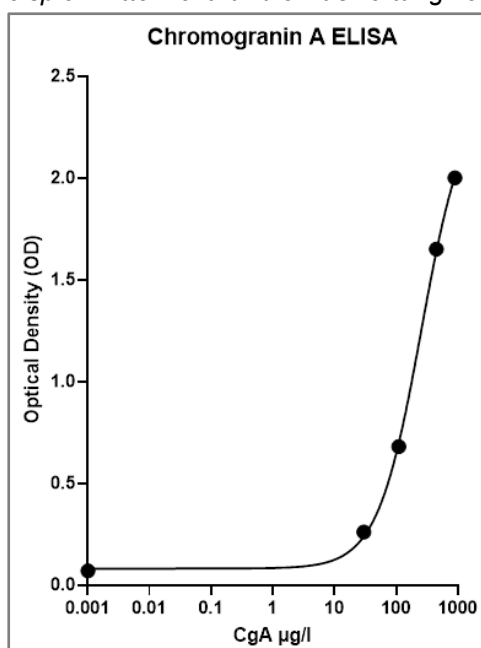
Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

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 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 unbekannten 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-zu-Lot			
	Probe	Mittelwert $\pm$ SD [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
Chromogranin A in serum (n = 3)	1	46,3 $\pm$ 2,3	5,1
	2	111 $\pm$ 7,2	6,5
	3	479 $\pm$ 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.

10. Referenzen/Literatur

- 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.
- Verbeek, W.H., C.M. Korse, and M.E. Tesselaar, *GEP-NETs UPDATE: Secreting gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours and biomarkers*. Eur J Endocrinol, 2016. **174**(1): p. R1-7.
- 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.
- Louthan, O., *Chromogranin a in physiology and oncology*. Folia Biol (Praha), 2011. **57**(5): p. 173-81.
- 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.
- 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.
- 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.

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

11. Änderungen

Version	Freigabedatum	Kapitel	Änderung
18.0	2021-07-09	Alle	– Überarbeitung des Assays aufgrund eines Lotwechsels des verwendeten abgestimmtem Antikörperpaares – Die IFU wurde gemäß der IVDR-Verordnung (EU) 2017/746 überarbeitet – Probenverdünnung wurde von 1+8 auf 1+20 geändert (Kapitel 6.2) – Typischer pathologischer Bereich wurde hinzugefügt (Kapitel 7.1) – Assay-Charakteristika wurden geändert (Kapitel 9.1) – Lot-zu-Lot und diagnostische Leistung wurden zu den Assay-Charakteristika hinzugefügt – Metrologische Rückführbarkeit wurde hinzugefügt (Kapitel 9.2) – Referenzen/Literatur wurde aktualisiert (Kapitel 10)
19.0	2022-06-27	2.2.2	– Medikamente, die den Chromograninspiegel beeinflussen können, wurden aktualisiert – Redaktionelle Änderungen
20.0	2023-03-20	7.1 9.1	– Genauere Beschreibung hinzugefügt – Lot-zu-Lot aktualisiert
21.0	2023-11-06	4.1 9.1	– Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert – Wiederfindung aktualisiert
22.0	2024-01-02	5	– Probenlagerung/-stabilität angepasst
23.0	2024-08-07	4.1 7	– Gefahrenkennzeichnung gemäß SDS aktualisiert – Anmerkung zum Verdünnungsfaktor bei der Berechnung hinzugefügt

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta

1. Bevezetés

1.1 A vizsgálat rendeltetése és elve

Enzim immunoassay a Chromogranin A szérumban történő mennyiségi meghatározására. A Chromogranin A meghatározása segít a neuroendokrin tumorok kimutatásában, és a rákkezelés lefolyásának értékelésére szolgál.

A kromogranin A (CgA) mennyiségi meghatározása az enzimimmunoassay alapelveit követi.

Először a mintákban, kontrollokban és standardokban lévő kromogranin A kötődik a 96 lyukú mikrotiterlemezre rögzített CgA-specifikus antitestekhez. Az inkubációt és a mosási lépéseket követően torna-peroxidázzal konjugált CgA antitestek hozzáadásával szendvicset képezünk. Az inkubációt követően a lyukakat alaposan átmossuk, és a szilárd fázishoz kötött komplexet TMB szubsztrát alkalmazásával mutatjuk ki, ami színreakciót eredményez. A reakciót 450 nm-es hullámhosszon követjük nyomon.

Egy standard görbe segítségével meghatározzák a minták CgA-koncentrációját. Az ELISA kézi feldolgozása ajánlott. Az automatikus laboratóriumi berendezések használata a felhasználó felelőssége. Ez az in vitro diagnosztika kizárólag professzionális használatra szolgál.

1.2 Klinikai alkalmazás

A kromogranin A (CgA) egy 439 aminosavból álló savas glikoprotein, amely a legtöbb neuroendokrin sejt szekréciós sűrű magsemcséiben van jelen. [1]. A kromogranin család legalább három különböző vízdíszható savas glikoproteinből áll (CgA, CgB és secretogranin II, néha kromogranin C-nek is nevezik). [1].

Stimuláció hatására CgA és más peptidhormonok és neuropeptidek szabadulnak fel. A CgA neuroendokrin eredetű tumorokból is kiválasztódik. [1].

A neuroendokrin tumorok (NET), amelyek neuroendokrin sejtekből erednek, széles körben elterjedtek a szervezetben. [2]. A NET leggyakoribb előfordulási helyei a tüdő, a gyomor, a vakbél, a vakbél, a vakbél, a nyombél, a hasnyálmirigy, a jejunum/ileum, a vastagbél és a végbél. [3]. A gasztrointesztinális traktusból eredő NET-eket összefoglalóan gastroenteropankreatikus neuroendokrin tumoroknak (GEP-NET) nevezik, és az incidensek kb. 2/3-át teszik ki. [3]. A NET éves incidenciáját 100 000 lakosra vetítve 2 - 5 esetre becsülik. [2].

A CgA széles körben expresszálódik a neuroendokrin rendszerben, és a neuroendokrin tumorok széles körének általános biomarkereként szolgál. [3]. A kromogranin A meghatározása segít a neuroendokrin tumorok kimutatásában, és a rákkezelés lefolyásának értékelésére szolgál. [3-6].

A terápiás következményeket soha nem szabad kizárólag laboratóriumi eredményekre alapozni, még akkor sem, ha ezeket az eredményeket a módszer minőségi kritériumainak megfelelően értékeli. Minden laboratóriumi eredmény csak egy része a beteg teljes klinikai képének.

Csak abban az esetben használható terápiás következményekre, ha a laboratóriumi eredmények elfogadható összhangban vannak a beteg általános klinikai képével.

2. Eljárási figyelmeztetések, iránymutatások, figyelmeztetések és korlátozások

2.1 Eljárási figyelmeztetések, iránymutatások és figyelmeztetések

- (23) Ez a készlet kizárólag professzionális használatra készült. A készlet sikeres használatához a felhasználóknak alaposan ismerniük kell ezt a protokollt. Kizárólag a készlethez mellékelt tesztelési utasítás érvényes, és azt kell használni a vizsgálat lefuttatásához. Megbízható teljesítmény csak a mellékelt utasítások szigorú és gondos betartásával érhető el.
- (24) Ezt a vizsgálatot egy bizonyos típusú mintára validálták a Rendeltetésszerű használatban megadottak szerint (lásd az 1. fejezetet). A készlet bármilyen, a felhasználási helytől eltérő használata a felhasználó felelőssége, és a gyártó nem vonható felelősségre.
- (25) A helyes laboratóriumi gyakorlat (GLP) elveit kell követni.
- (26) A potenciálisan káros anyagoknak való kitettség csökkentése érdekében szükség esetén viseljen laboratóriumi köpenyt, eldobható védőkesztyűt és védőszemüveget.
- (27) Ha a termékkel kapcsolatban súlyos incidensek történnek, azokat jelenteni kell a gyártónak és az illetékes nemzeti hatóságoknak.
- (28) A készlet összes reagensét és a mintákat szobahőmérsékletre kell hozni, és használat előtt óvatosan, de alaposan össze kell keverni. Hígításhoz vagy rekonstitúcióhoz ionmentesített, desztillált vagy ultratiszta vizet használjon. Kerülje a reagensek és minták ismételt fagyasztását és felolvasztását.
- (29) A mikrolemez lekapható csíkokat tartalmaz. A fel nem használt lyukakat 2-8° C-on kell tárolni a lezárt, nedvszívószerrel ellátott fóliatasakban, és a mellékelt keretben kell felhasználni. A keretből használat céljából kivett mikrotitercsíkokat a keveredés elkerülése érdekében megfelelően meg kell jelölni.
- (30) A minta kétszeri meghatározása erősen ajánlott.

- (31) A vizsgálat megkezdése után minden lépést megszakítás nélkül be kell fejezni. Győződjön meg arról, hogy a szükséges reagensek, anyagok és eszközök a megfelelő időben készen állnak a használatra.
- (32) Az inkubációs idő befolyásolja az eredményeket. Minden kutató ugyanabban a sorrendben és időintervallumban kell kezelni.
- (33) A reagensek keresztszennyeződésének elkerülése érdekében minden egyes reagens, minta, standard és kontroll adagolásához új, eldobható pipettahegyeket használjon.
- (34) Minden egyes futtatáshoz standard görbét kell készíteni.
- (35) A kontrolloknak minden egyes futtatásban szerepelniük kell, és a megállapított megbízhatósági határokon belül kell maradniuk. A konfidenciahatárokat a készlethez mellékelt QC-jelentés tartalmazza.
- (36) Ne keverje a különböző tételszámú készletkomponenseket egy vizsgálaton belül, és ne használja a reagenseket a készlet címkéjén feltüntetett lejárat időn túl.
- (37) Kerülje a 0,25 M H₂ SO₄ 0,25 M H SO tartalmú stoppolóoldattal való érintkezést. Bőrirritációt és égési sérüléseket okozhat. Szemmel vagy bőrrel való érintkezés esetén azonnal öblítse le vízzel.
- (38) A TMB-szubsztrátum irritáló hatással van a bőrre és a nyálkahártyára. Esetleges érintkezés esetén bőséges mennyiségű vízzel mossa ki a szemet, a bőrt pedig szappannal és bőséges mennyiségű vízzel. Újbóli felhasználás előtt öblítse le a szennyezett tárgyakat.
- (39) A készletben található veszélyes anyagokkal kapcsolatos információkért kérjük, olvassa el a biztonsági adatlapot (SDS). A termék biztonsági adatlapja közvetlenül a gyártó weboldalán vagy kérésre elérhető.
- (40) A készlet reagenseit veszélyes hulladéknak kell tekinteni, és a nemzeti előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.
- (41) Az ebben a vizsgálati utasításban megadott várható referenciaértékek csak tájékoztató jellegűek. Javasoljuk, hogy minden laboratórium maga állapítsa meg a saját referenciaintervallumait.
- (42) A tesztkészlet vagy az alkatrészek súlyos sérülése esetén a gyártót legkésőbb a készlet kézhezvételét követő egy héten belül írásban értesíteni kell. Súlyosan sérült egyes alkatrészek nem használhatók a vizsgálathoz. Ezeket megfelelően kell tárolni, amíg a gyártó nem dönt arról, hogy mi legyen velük. Ha úgy döntenek, hogy már nem alkalmasak a mérésekre, akkor a nemzeti előírásoknak megfelelően kell megsemmisíteni őket.
- (43) Az ezzel a tesztkészlettel kapott eredmények nem tekinthetők a terápiás következmények kizárólagos indokának, hanem azokat össze kell vetni más diagnosztikai vizsgálatokkal és klinikai megfigyelésekkel.
- (44) A készlet humán szérumot vagy plazmát tartalmazó reagenseit HIV I/II, HBsAg és HCV szempontjából bevizsgálták és negatívnak bizonyultak jóváhagyott eljárásokkal. Minden reagens azonban használat és ártalmatlanítás során potenciális biológiai veszélyforrásként kezelendő.

2.2 Korlátozások

A minták nem megfelelő kezelése vagy a vizsgálat módosítása befolyásolhatja az eredményeket.

A módszer összehasonlítása során használt minták mintegy 10%-ánál eltérést észleltek a Kryptor CgA II és az ELISA mérések között. Ezek kizárólag olyan minták voltak, amelyek CgA-koncentrációja 350 és 900 µg/l között volt.

A felhasznált specifikus antitestek szekvenciáját ellenőrizték az esetleges keresztreakciók szempontjából. Még ha nem is sikerült jelentős keresztreakciókat kimutatni, nem zárható ki, hogy ritka egyedi esetekben és a gyógyszeres kezeléstől vagy a betegségstátusztól függően az értékek befolyásolhatók.

Ha a Chromogranin A meghatározást a beteg nyomon követésének részeként használják, ezért a következő eljárást javasoljuk:

- A beteg mintáját a kezelés során mindig ugyanazzal a módszerrel kell vizsgálni.
- Amennyiben a nyomon követés során eltérések mutatkoznak, meg kell vizsgálni, hogy történt-e változás a gyógyszeres kezelésben vagy az életmódban.

Ha további kérdése van, kérjük, forduljon a gyártóhoz.

2.2.1 Zavaró anyagok

A csapadékat vagy fibrinszájakat tartalmazó szérumminták pontatlan eredményeket okozhatnak. A biotin (legfeljebb 1 200 ng/ml), a hemolitikus minták (legfeljebb 1 mg/ml hemoglobin), az ikterikus minták (legfeljebb 50 mg/dl bilirubin) és a lipidszegény minták (legfeljebb 1 700 mg/dl trigliceridek) nem befolyásolják a vizsgálati eredményeket. Kétség esetén ajánlott, hogy hemolitikus, ikterikus és lipémiás mintákat ne használjunk a vizsgálatban.

2.2.2. 2Kábítószeres interferenciák

Az olyan gyógyszerek, mint a protonpumpa-gátlók, a szelektív szerotonin visszavétel gátlók, a hisztamin-2 típusú receptor antagonisták és a szomatostatintin analógok befolyásolhatják a szérum CgA szintjét.

2.2.3 Nagy dózisú kampóhatás

Ebben a vizsgálatban nem figyeltek meg horoghatást.

3. Storage és stabilitás

A készletet és a reagenseket 2-8° C-on tárolja a lejárati időig. Ne használja a készletet és a komponenseket a készlet címkéjén feltüntetett lejárati időn túl. Felbontás után a reagensek 2 hónapig stabilak 2-8 °C-on tárolva. Miután az ELISA-lemez újrazárható tasakját felnyitotta, ügyelni kell arra, hogy az újra szorosan záródjon, beleértve a nedvszívószert is.

4. Anyagok**4.1A készlet tartalma**

BA E-0030	WASH-CONC 50x	Mosási puffer koncentrátum - 50x koncentrálni
Tartalom:	Puffer nemionos detergenssel és fiziológiás pH-val	
Kötet:	1 x 20 ml/flakon, lila kupakkal	
BA E-0055	SUBSTRÁTUM	Alátét - használatra kész
Tartalom:	3,3',5,5'-tetrametil-benzidin, szubsztrátpuffer és hidrogén-peroxid tartalmú kromogén szubsztrát	
Kötet:	1 x 12 ml/flakon, fekete kupak	
BA E-0080	STOP-SOLN	Stop Solution - használatra kész
Tartalom:	0,25 M kénsav	
Kötet:	1 x 12 ml/flakon, szürke kupak	
TM E-9010	CONJUGATE	Antitest-konjugátum - használatra kész
Tartalom:	Nyúl anti-kromogranin A antitest, peroxidázzal konjugálva	
Kötet:	1 x 6 ml/flakon, piros kupak	
Leírás:	A faj nyúl	
Veszélyt jelző pictogramok:		
	GHS07	
Figyelmeztető szó:	Figyelem	
Veszélyes összetevők:	2-methyl-2H-isothiazol-3-one	
Veszély leírása:	H317 Allergiás bőrreakciót okozhat.	
Óvintézkedések:	P280 Védőkesztyű viselése. P302+P352 HA BŐRRE KERÜL, bő vízzel mossuk le. P333+P313 Ha bőrirritáció vagy kiütés jelentkezik: Kérjen orvosi tanácsot/ellátást. P501 Tartalmat/tartályt engedéllyel rendelkező hulladékgyűjtő helyen kell elhelyezni .	
TM E-9013	ASSAY-BUFF	Assay puffer - használatra kész
Tartalom:	Puffer fehérjékkel és higanymentes tartósítószerrel	
Kötet:	1 x 50 ml/flakon, kék kupak	
Leírás:	A pufferben lévő fehérje fajtája szarvasmarhaféle	
TM E-9031	96	Chromogranin A mikrotitercsíkok - használatra készen
Tartalom:	1 x 96 lyukú (12x8) kecske anti-kromogranin A ellenanyaggal előzetesen bevont mikrocélás lemez, visszazárható tasakban, nedvszívószerrel.	
Leírás:	A faj kecske	

4.2 Kalibrálás és ellenőrzések

Szabványok és ellenőrzések - használatra kész

Cat. no.	Komponens	Szín/sapka	Koncentráció [$\mu\text{g/l}$] CgA	Térfogat/Impu lla
TM E-9001	A STANDARD	fehér	0	1 ml
TM E-9002	STANDARD B	sárga	30	1 ml
TM E-9003	STANDARD C	narancs	110	1 ml
TM E-9004	STANDARD D	kék	450	1 ml
TM E-9005	STANDARD E	szürke	900	1 ml
TM E-9051	CONTROL 1	zöld	A várható értéket és az elfogadható tartományt lásd a QC- jelentésben.	1 ml
TM E-9052	CONTROL 2	piros		1 ml

Tartalom: Assay puffer meghatározott mennyiségű humán kromogranin A-val és stabilizáló fehérjével.

Leírás: A kromogranin A humán eredetű, a stabilizáló fehérje szarvasmarha eredetű.

4.3 További szükséges, de a készletben nem szereplő anyagok

- Víz (deionizált, desztillált vagy ultra-tiszta)
- nedvszívó anyag (papírtörölő)

4.4 Szükséges, de a készletben nem szereplő kiegészítő felszerelések

- Kalibrált precíziós pipetták 20 - 400 µl közötti mennyiségek adagolására
- Mikrotiterlemez mosó berendezés (kézi, félautomata vagy automatizált)
- ELISA-olvasó, amely képes az abszorbancia mérésére 450 nm-en és lehetőség szerint 620-650 nm-en.
- Mikrotiterlemez rázógép (rázási amplitúdó 3 mm; kb. 600 rpm)
- Vortex keverő

5. Mintavétel, kezelés és tárolás**Szérum**

Vegyen vért vénapunkcióval, hagyja megalvadni, és a gyártó utasításai szerint centrifugálással válassza el a szérumot. Ne centrifugáljon a teljes alvadás bekövetkezte előtt. A véralvadást gátló kezelésben részesülő betegeknél megnővekedhet az alvadási idő.

Kétség esetén ajánlott, hogy hemolitikus, ikterikus és lipémiás mintákat ne használjunk a vizsgálatban (lásd 2.2.1.).

Tárolás: 8 °C-on; hosszabb ideig (legfeljebb 6 hónapig) -20 °C-on tárolva.

Kerülni kell az ismételt fagyasztást és felolvasztást.

6. Vizsgálati eljárás

Hagyja, hogy minden reagens és minta elérje a szobahőmérsékletet, és használat előtt óvatos inverzióval alaposan keverje össze. Számozza meg a mikrotiterlemezeket (a használathoz a keretből kivett mikrotitercsíkokat ennek megfelelően kell megjelölni, hogy elkerülhető legyen a keveredés). Ajánlatos a duplikált meghatározásokat elvégezni d.

Az antiszérumok és az enzimkonjugátum kötődése, valamint az enzim aktivitása hőmérsékletfüggő. Minél magasabb a hőmérséklet, annál magasabbak lesznek az abszorpciós értékek. A változó inkubációs idő hasonlóan befolyásolja az abszorbanciát. Az optimális hőmérséklet az enzimimmunoassay során 20-25 °C között van.

⚠ A következő specifikációkkal rendelkező mikrotiterlemez-rázógép használata kötelező: rázási amplitúdó 3 mm; kb. 600 rpm. Ettől eltérő beállítású rázás befolyásolhatja az eredményeket.

6.1 Reagensok előkészítése és további megjegyzések**Mosási puffer**

Hígítsa a 20 ml **WASH-CONC 50X** mosópuffer-koncentrátumot vízzel 1000 ml végtérfogatra.

Tárolás: 2 hónap 2-8 °C-on

Chromogranin A mikrotitercsíkok

Ritka esetekben a blokkoló és stabilizáló reagens maradványai apró, fehér pontok vagy vonalak formájában láthatók a lyukakban. Ezek a maradványok nem befolyásolják a termék minőségét.

6.2 A minták előkészítése - Hígítás

1. Használat előtt a szérummintákat **1+20 arányban kell** hígítani **az ASSAY-BUFF-fel**, pl. 20 µl szérummintát + 400 µl **ASSAY-BUFF-ot**.

Azokat a szérummintákat, amelyekről kiderült, hogy nem a görbén vannak, szintén ennek megfelelően kell hígítani a következőkkel **ASSAY-BUFF-fel**, és újra kell vizsgálni.

6.3 Chromogranin A ELISA

1.	Pipettázzon 50 µl standardot, kontrollt és hígított mintát a Chromogranin A Microtiter Strips  96 megfelelő mélyedéseibe, és inkubálja 1 órán át RT-n (20-25 °C), rázógépen (kb. 600 rpm).
2.	Dobja el vagy szívja le a lyukak tartalmát. Mossuk a lemezt 4-szer 300 µl mosópuffer hozzáadásával, dobjuk el a tartalmát , és minden alkalommal töröljük szárazra a megfordított lemezt nedvszívó anyagra koppintva .
3.	Pipettázzon 50 µl CONJUGÁTOT minden mélyedésbe, és inkubálja 1 órán át RT-n (20-25 °C), rázógépen (kb. 600 rpm).
4.	Dobja el vagy szívja le a lyukak tartalmát. Mossuk a lemezt 4-szer 300 µl mosópuffer hozzáadásával, dobjuk el a tartalmát , és minden alkalommal töröljük szárazra a megfordított lemezt nedvszívó anyagra koppintva .
5.	Pipettázzon 100 µl SUBSTRÁTUMOT minden mélyedésbe.
6.	Inkubáljuk 25 ± 5 percig RT-n (20-25 °C), rázógépen (kb. 600 rpm).  Kerülje a közvetlen napfénynek való kitettséget!
7.	Adjon 100 µl STOP-SOLN-t minden lyukba, és rázza fel röviden a mikrotiterlemezt.
8.	Olvassa le az oldat abszorbanciáját a mélyedésekben 10 percen belül, 450 nm-re állított mikrotiterlemez-olvasóval (ha rendelkezésre áll, 620 nm és 650 nm közötti referencia hullámhossz ajánlott).

7. Az eredmények kiszámítása

Mérési tartomány	Chromogranin A a szérumban
	2,3 - 900 µg/l

Az ismeretlen minták koncentrációjának meghatározására használható standardgörbét úgy kapjuk meg, hogy a standardok abszorbancia-méréseit (az abszorbancia átlagának kiszámítása) (lineáris, y-tengely) a megfelelő standardkoncentrációkkal (logaritmikus, x-tengely) szemben ábrázoljuk, az A standard 0,001 µg/l koncentrációját használva (ez az összehangolás az adatok logaritmikus ábrázolása miatt kötelező). A görbeillesztéshez használjon nemlineáris regressziót (pl. 4 paraméteres, Marquardt).

A minták és a kontrollok koncentrációja közvetlenül a standard görbéről olvasható le.

A legmagasabb standardnál (E standard) magasabb koncentrációjú mintákat **ASSAY-BUFF-al** kell megfelelően hígítani, és újra kell vizsgálni. A koncentrációk kiszámításához ezt a hígítási tényezőt figyelembe kell venni.

7.1 Várható referenciaérték

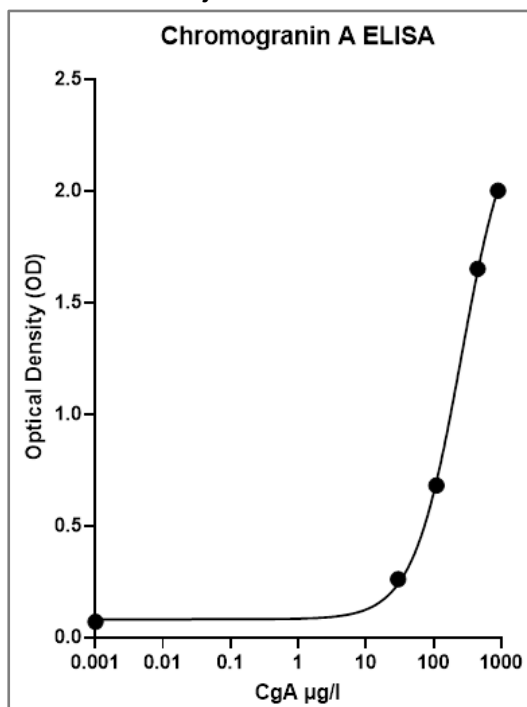
Erősen ajánlott, hogy minden laboratórium határozza meg saját referenciaértékeit.

Az alább feltüntetett várható referenciaértékek a B·R·A·H·M·M·S Kryptor CgA II módszerrel végzett összehasonlító vizsgálatokon alapulnak. A várható referenciaértéket a van Treijen, M.J.C., M.J.C. és munkatársai által végzett vizsgálatban határozták meg. [7].

	Chromogranin A a szérumban
Referenciaérték (ULN)	< 100 µg/l
Tipikus patológiai tartomány	Legfeljebb 143 500 µg/l

7.2 Tipikus standard görbe

⚠ Pélá: Ne használja számításához!



8. Ellenőrző minták

A nemzeti előírásoknak megfelelően ajánlott kontrollmintákat használni. Használjon kontrollmintákat normál és kóros szinten egyaránt. A kereskedelmi forgalomban kapott kontrollmintákat úgy kell kezelni, mint az ismeretlen mintákat. A kontrollmintáknak a megállapított konfidenciahatárokon belül kell lenniük. A kit kontrolljainak megbízhatósági határai a QC-jelentésben szerepelnek.

9. Assay jellemzők

9.1 Teljesítményadatok

Analitikai érzékenység	
Blank határérték (LOB)	0,9 µg/l
Kimutatási határérték (LOD)	1,4 µg/l
Mennyiségmeghatározási határérték (LOQ)	2,3 µg/l

Precíziós					
Intra-Assay			Inter-Assay		
n = 12			n = 10		
Minta	Átlag ± SD [µg/l]	CV [%]	Minta	Átlag ± 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			
	Minta	Átlag $\pm$ SD [μ g/l]	CV [%]
Chromogranin A a szérumban (n = 3)	1	46.3 $\pm$ 2.3	5.1
	2	111 $\pm$ 7.2	6.5
	3	479 $\pm$ 61.8	12.9

Visszanyerhetőség			
	Tartomány [μ g/l]	Átlag [%]	Tartomány [%]
Chromogranin A	43.6 - 502	102	100 - 104

Linearitás			
	Soros hígítás legfeljebb	Átlag [%]	Tartomány [%]
Chromogranin A	1:64	92	91 - 96

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

Diagnosztikai teljesítmény GEP-NET [7]			
Diagnosztikai specifikusság [%]	Diagnosztikai érzékenység [%]	Pozitív prediktív érték (PPV) [%]	Negatív prediktív érték (NPV) [%]
83	56	87	49
Pozitív valószínűségi arány (LR+)		Negatív valószínűségi arány (LR-)	
3.3		0.53	

9.2 Metrológiai Nyomonkövethetőség

A Chromogranin A ELISA standardokhoz és kontrollokhoz rendelt értékek a B·R·A·H·M·M·S Kryptor CgA II referenciamódszerre vezethetők vissza.

Szabványok és ellenőrzések	Bizonytalanság [%]
	7.5

Chromogranin A ELISA	Kiterjesztett bizonytalanság [%] k = 2*
	16.5

*Ez egy olyan intervallumot határoz meg a mért eredményről, amely 95%-os valószínűséggel tartalmazza a valódi értéket.

10. Referenciák/Irodalom

1. O'Toole, D., et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: biochemical markers*. Neuroendokrinológia, 2009. **90**(2): p. 194-202.
2. Verbeek, W.H., C.M. Korse és M.E. Tesselaar, *GEP-NET-ek UPDATE: Szekretáló gasztroenteropankreatikus neuroendokrin tumorok és biomarkerek*. Eur J Endocrinol, 2016. **174**(1): p. R1-7.
3. Singh, S. és C. Law, *Chromogranin A: érzékeny biomarker a gastroenteropankreatikus neuroendokrin tumorok kimutatására és kezelés utáni nyomon követésére*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **6**(3): p. 313-34.
4. Louthan, O., *Chromogranin a az élettanban és az onkológiában*. Folia Biol (Praha), 2011. **57**(5): p. 173-81.
5. Yang, X., et al., *A keringő kromogranin a neuroendokrin tumorok diagnosztikai értéke: szisztematikus áttekintés és metaanalízis*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0124884.
6. Corti, A., F. Marcucci és 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: Egy nagy, független validációs vizsgálat eredményei*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 740.

Frissített irodalomért vagy egyéb információkért kérjük, forduljon helyi szállítójához.

11. Változások

Verzió	Megjelenési dátum	Fejezet	Változás
18.0	2021-07-09	Minden	– A vizsgálat felülvizsgálata a felhasznált megfelelő ellenanyagpár tételének változása miatt – A használati utasítást az IVDR (EU) 2017/746 rendeletnek megfelelően felülvizsgálták. – A minta hígítása 1+8-ról 1+20-ra változott (6.2. fejezet). – Tipikus kóros tartomány került beillesztésre (7.1. fejezet). – A vizsgálati jellemzők megváltoztak (9.1. fejezet) – A vizsgálat jellemzői kiegészültek a tételek közötti és a diagnosztikai teljesítményt illetően. – A szöveg kiegészült a metrológiai nyomon követhetőséggel (9.2. fejezet). – A hivatkozások/irodalom frissítésre került (10. fejezet)
19.0	2022-06-27	2.2.2	– A kromogranin szintjét befolyásoló gyógyszerek frissültek – Szerkesztői változtatások
20.0	2023-03-20	7.1 9.1	– Részletesebb leírás hozzáadva – Lot-to-Lot frissítve
21.0	2023-11-06	4.1 9.1	– Az SDS szerint frissített veszélyességi címkézés – A helyreállítás frissítve
22.0	2024-01-02	5	– A minta tárolása/stabilitása igazítva
23.0	2024-08-07	4.1 7	– A veszélyes anyagok címkézése az SDS (Biztonságos adatlap) szerint frissítve – A számítás során a hígítási tényezőhöz hozzáadott megjegyzés

DEMEDITEC TESZTEKKEL HASZNÁLT SZIMBÓLUMOK

Szimbólum	Angol	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	Európai megfeleléség	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Az európai normáknak megfelelő	Conformidad europea	Conformità europea
	Konzultáljon a használati utasítással	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso (Használati útmutató)
	In vitro diagnosztikai eszköz	In-vitro-Diagnostikum	felhasználás Diagnosztikai in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	Kizárólag kutatási célokra	Nur Forschungszwecke für	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Katalógusszám	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. Szám / tételkód	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto nem
	Elégéséges a <n> tesztekhez/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests (elegendő tartalom "n" tesztekhez)	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Figyelmeztetések és óvintézkedések	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni (előzetes figyelmeztetések és elővigyázatossági intézkedések)
	Tárolási hőmérséklet	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Lejárat dátum	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Jogi gyártó	Gyártó	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Forgalmazza</i>	Forgalmazza	Vertrieb durch	Elosztás par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Verzió	Verzió	Verzió	Versión	Versione
	Egyszer használatos	Einmalverwendung	À használat egyedi	Uso único	Uso una volta

1. Wprowadzenie

1.1 Przeznaczenie i zasada działania testu

Test immunoenzymatyczny do ilościowego oznaczania chromograniny A w surowicy. Oznaczenie chromograniny A pomaga w wykrywaniu guzów neuroendokrynnych i służy do oceny przebiegu leczenia raka.

Ilościowe oznaczanie chromograniny A (CgA) odbywa się zgodnie z podstawowymi zasadami testu immunoenzymatycznego.

Na początku, chromogranina A w próbkach, kontrolach i standardach wiąże się do przeciwciał specyficznych dla CgA, opłaszczonych na 96-dółkowej płytce mikrotitracyjnej. Po inkubacji oraz etapie płukania, dodaje się przeciwciała anty-CgA skoniugowane z peroksydazą chrzanową w celu utworzenia „kanapki”. Po kolejnej inkubacji i dokładnym odplukaniu koniugatu, kompleks który związał się z fazą stałą płytki jest poddawany detekcji za pomocą TMB, będącego substratem dla peroksydazy. Reakcję monitoruje się za pomocą czytnika mikropłytek przy długości fali 450 nm.

Stężenia CgA w próbkach określa się za pomocą krzywej standardowej. Zalecane jest manualne wykonanie testu. Odpowiedzialność za użycie automatycznego sprzętu laboratoryjnego spoczywa na użytkowniku. Niniejszy zestaw jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego.

1.2 Zastosowanie kliniczne

Chromogranina A (CgA) jest kwaśną glikoproteiną składającą się z 439 aminokwasów, która występuje w pęcherzykach wydzielniczych większości komórek neuroendokrynnych [1]. Rodzina chromogranin składa się z co najmniej trzech różnych rozpuszczalnych w wodzie kwaśnych glikoprotein (CgA, CgB i sekretogranina II, czasami nazywana chromograniną C) [1].

Po stymulacji uwalniane są CgA i inne hormony peptydowe oraz neuropeptydy. CgA jest także wydzielane z guzów pochodzenia neuroendokrynnego [1].

Guzy neuroendokryne (NET), które wywodzą się z komórek neuroendokrynnych są szeroko rozpowszechnione w organizmie [2]. Najczęstszymi lokalizacjami NET są płuca, żołądek, wyrostek robaczkowy, jelito ślepe, dwunastnica, trzustka, jelito czcze/kręte, okrężnica i odbytnica [3]. NET wywodzące się z przewodu pokarmowego określane są zbiorczo jako guzy neuroendokryne żołądka i jelit (GEP-NET) i stanowią około 2/3 przypadków NET [3]. Roczną zapadalność na NET szacuje się na 2–5 przypadków na 100000 [2].

CgA jest powszechnie uwalniane w układzie neuroendokrynnym i służy jako ogólny biomarker dla wielu różnych guzów neuroendokrynnych [3]. Oznaczanie chromograniny A pomaga w wykrywaniu guzów neuroendokrynnych i służy do oceny przebiegu leczenia onkologicznego [3–6].

Konsekwencje terapeutyczne nie powinny nigdy opierać wyłącznie na wynikach badań laboratoryjnych, nawet jeśli wyniki te ocenia się zgodnie z kryteriami jakości metody. Wynik badań laboratoryjnych stanowi jedynie część całkowitego obrazu klinicznego pacjenta.

Jedynie w przypadku, gdy wyniki badań laboratoryjnych są w zadowalającym stopniu zgodne z ogólnym obrazem klinicznym pacjenta, można je wykorzystać do celów terapeutycznych.

2. Środki ostrożności, wytyczne, ostrzeżenia i czynniki limitujące

2.1 Środki ostrożności, wytyczne, ostrzeżenia

- (45) Ten zestaw jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego. Użytkownicy powinni dokładnie rozumieć protokół, aby z powodzeniem korzystać z tego zestawu. Tylko instrukcja testu dołączona do zestawu jest właściwa, aby wykonać oznaczenie. Miarodajne wyniki można osiągnąć tylko poprzez ścisłe i staranne przestrzeganie dostarczonej instrukcji.
- (46) Ten test został zwalidowany dla określonego typu próbki, zgodnie z przeznaczeniem (patrz rozdział 1). Za każde inne użycie zestawu odpowiada użytkownik, a producent nie może być pociągany do odpowiedzialności.
- (47) Należy przestrzegać zasad Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP).
- (48) Aby zmniejszyć narażenie na potencjalnie szkodliwe substancje, należy nosić fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawice ochronne i okulary ochronne.
- (49) W przypadku wystąpienia poważnych incydentów w związku z tym produktem, należy je zgłosić producentowi i właściwym władzom krajowym.
- (50) Wszystkie odczynniki i próbki z zestawu należy doprowadzić do temperatury pokojowej i delikatnie, ale dokładnie wymieszać przed użyciem. Do rozcieńczania należy używać wody dejonizowanej, destylowanej lub ultraczystej. Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania odczynników i próbek.
- (51) Mikropłytki zawiera odrywane paski. Niewykorzystane paski należy przechowywać w temperaturze 2–8 °C w zamkniętym woreczku foliowym ze środkiem osuszającym i używać w dostarczonej ramce. Paski, które są usuwane z ramki w celu użycia, powinny być odpowiednio oznakowane, aby uniknąć pomyłki.

- (52) Zalecane jest podwójne oznaczenie próbki.
- (53) Po rozpoczęciu testu wszystkie kroki należy wykonać bez przerwy. Upewnić się, że wymagane odczynniki, materiały i urządzenia są przygotowane do użycia we właściwym czasie.
- (54) Czasy inkubacji mają wpływ na wyniki. Wszystkie dołki powinny być napełniane w tej samej kolejności i odstępach czasu.
- (55) Do dozowania każdego odczynnika, próbki, standardu i kontroli należy używać nowych jednorazowych końcówek do pipet, aby uniknąć zanieczyszczeń krzyżowych.
- (56) Dla każdego oznaczenia należy ustalić krzywą standardową.
- (57) Próby kontrolne należy uwzględnić w każdym oznaczaniu, a ich wartości muszą się mieścić w ustalonych granicach ufności. Granice ufności są wymienione w raporcie QC dostarczonym z zestawem.
- (58) Nie łączyć komponentów zestawu o różnych numerach serii i nie używać odczynników po upływie daty ważności podanej na etykiecie zestawu.
- (59) Unikać kontaktu z roztworem zatrzymującym zawierającym 0,25 M H₂SO₄. Może powodować podrażnienia i oparzenia skóry. W przypadku kontaktu z oczami lub skórą natychmiast spłukać wodą.
- (60) Substrat TMB działa drażniąco na skórę i błonę śluzową. W przypadku kontaktu z oczami przemyć dużą ilością wody, a skórą mydłem i dużą ilością wody.
- (61) Informacje na temat niebezpiecznych substancji zawartych w zestawie znajdują się w karcie charakterystyki (SDS). Karta Charakterystyki dla tego produktu jest udostępniana bezpośrednio na stronie internetowej producenta lub na życzenie.
- (62) Odczynniki z zestawu należy traktować jako odpady niebezpieczne i utylizować zgodnie z przepisami krajowymi.
- (63) Oczekiwane wartości odniesienia podane w niniejszej instrukcji są jedynie orientacyjne. Zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło własne przedziały referencyjne.
- (64) W przypadku poważnego uszkodzenia zestawu testowego lub jego komponentów należy poinformować producenta pisemnie najpóźniej tydzień po otrzymaniu zestawu. Do uruchomienia próbnego nie wolno używać poważnie uszkodzonych pojedynczych elementów. Muszą być odpowiednio przechowywane, dopóki producent nie zdecyduje, co z nimi zrobić. Jeśli zostanie podjęta decyzja, że nie nadają się już do pomiarów, należy je zutylizować zgodnie z przepisami krajowymi.
- (65) Odczynniki tego zestawu zawierające ludzką surowicę lub osocze zostały przetestowane i potwierdzone zatwierdzonymi procedurami jako ujemne pod kątem HIV I/II, HBsAg i HCV. Wszystkie odczynniki należy jednak traktować jako potencjalne zagrożenie biologiczne w użytkowaniu i utylizacji.
- (66) Uzyskane wyniki nie powinny być traktowane jako jedyny powód jakichkolwiek konsekwencji terapeutycznych i muszą być skorelowane z innymi testami diagnostycznymi i obserwacjami klinicznymi.

2.2 Ograniczenia

Jakiegokolwiek niewłaściwe postępowanie z próbkami lub modyfikacja testu może mieć wpływ na wyniki. W nieco ponad 10% próbek użytych w porównaniu metod wykryto rozbieżność między pomiarami Kryptor II i ELISA. Były to próbki, w których stężenia CgA zawierały się w granicach 350–900 µg/l.

Sekwencję zastosowanych specyficznych przeciwciał sprawdzono pod kątem możliwych reakcji krzyżowych. Nawet jeśli nie wykryto żadnych znaczących reakcji krzyżowych, nie można wykluczyć, że w rzadkich indywidualnych przypadkach i w zależności od leczenia lub stanu choroby może się to zmienić.

Jeśli oznaczanie chromograniny A jest stosowane w ramach obserwacji pacjenta, zalecamy następującą procedurę:

- Próbkę pacjenta powinna być zawsze badana tą samą metodą w trakcie leczenia.
- W przypadku nieprawidłowości należy zbadać, czy zmiana leków lub stylu życia mogły mieć na to wpływ.

W przypadku dalszych pytań prosimy o kontakt z producentem.

2.2.1 Substancje interferujące

Próbki surowicy zawierające osady lub zwiłknienia fibryny mogą dawać niemiernodajne wyniki. Biotyna (do 1200 ng/ml), próbki hemolityczne (do 1 mg/ml hemoglobiny), próbki żółtaczkowe (do 50 mg/dl bilirubiny) i próbki lipemiczne (do 1700 mg/dl triglicerydów) nie mają wpływu na wyniki testu. W razie wątpliwości zaleca się, aby w teście nie używać próbek hemolitycznych, żółtaczkowych i lipemicznych.

2.2.2 Interferencje z lekami

Leki takie jak inhibitory pompy protonowej, selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny, antagoniści receptora histaminowego typu 2 i analogi somatostatyny mogą wpływać na poziom CgA w surowicy.

2.2.3 Efekt wysokiej dawki (efekt „hook”)

W teście tym nie zaobserwowano efektu wysokiej dawki.

3. Przechowywanie i stabilność

Przechowywać zestaw i odczynniki w temperaturze 2–8 °C do daty ważności. Nie używać składników po upływie daty ważności podanej na etykiecie zestawu. Po otwarciu odczynniki są stabilne przez 2 miesiące, jeśli są przechowywane w temperaturze 2–8 °C. Należy zwrócić wyjątkową uwagę i dołożyć staranności aby opakowanie na nieużyte paski testu było szczelnie zamknięte i zawierało w środku desykant.

4. Materiały**4.1 Zawartość zestawu**

BA E-0030	WASH-CONC 50x	Bufor Płuczący – stężony 50x
Zawartość:	Bufor zawierający niejonowy detergent, o fizjologicznym pH	
Objętość:	1 x 20 ml/fiolka, fioletowa zakrętka	
BA E-0055	SUBSTRATE	Substrat – gotowy do użycia
Zawartość:	Chromogeny substrat zawierający 3,3',5,5'-tetrametylobenzydynę, bufor i nadtlenek wodoru	
Objętość:	1 x 12 ml/fiolka, czarna zakrętka	
BA E-0080	STOP-SOLN	Roztwór zatrzymujący – gotowy do użycia
Zawartość:	0.25 M kwas siarkowy	
Objętość:	1 x 12 ml/fiolka, szara zakrętka	
TM E-9010	CONJUGATE	Koniugat – gotowy do użycia
Zawartość:	Królicze przeciwciało anti-chromogranina A, skoniugowane z peroksydazą	
Objętość:	1 x 6 ml/fiolka, czerwona zakrętka	
Opis:	Gatunek - królik	
Piktogramy:		
	GHS07	
Hasło ostrzegawcze:	Ostrzeżenie	
Substancje niebezpieczne	2-methyl-2H-isothiazol-3-one	
Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia:	H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry.	
Zwroty wskazujące środki ostrożności:	P280 Stosować rękawice ochronne. P302+P352 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody. P333+P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P501 Zawartość/pojemnik należy oddać do autoryzowanego punktu zbiórki odpadów.	
TM E-9013	ASSAY-BUFF	Bufor testowy – gotowy do użycia
Zawartość:	Bufor zawierający białka i konserwant bez obecności rtęci	
Objętość:	1 x 50 ml/fiolka, niebieska zakrętka	
Opis:	Pochodzenie białka użytego w buforze - bydlęce	
TM E-9031	 96	Paski płytki opłaskane przeciwciałami Anty-Chromogranina A – gotowe do użycia
Zawartość:	1 x 96 dołkowa płytka (12x8) opłaskana przeciwciałem w foliowym opakowaniu do wielokrotnego zamknięcia, zawierającym desykant	
Opis:	Gatunek - koza	

4.2 Standardy i kontrole

Standardy i kontrole – gotowe do użycia

Nr kat.	Komponent	Kolor/Zakrętka	Stężenie [$\mu\text{g/l}$] CgA	Objętość/Fiolka
TM E-9001	STANDARD A	Biała	0	1 ml
TM E-9002	STANDARD B	Żółta	30	1 ml
TM E-9003	STANDARD C	Pomarańczowy	110	1 ml
TM E-9004	STANDARD D	Niebieski	450	1 ml
TM E-9005	STANDARD E	Szary	900	1 ml
TM E-9051	CONTROL 1	Zielony	Odnieść się do raportu QC po oczekiwanej wartości i dopuszczalny zakres.	1 ml
TM E-9052	CONTROL 2	Czerwony		1 ml

Zawartość: Bufor testowy z określoną ilością ludzkiej chromograniny A i stabilizującym białkiem.

Opis: Chromogranina A pochodzi od człowieka, białko stabilizujące jest pochodzenia bydłęcego.

4.3 Materiały wymagane niedostarczone w zestawie

- woda (dejonizowana, destylowana, ultraczysta)
- Materiał papierowy (ręcznik papierowy)

4.4 Potrzebne urządzenia

- Skalibrowane pipety automatyczne 20-400 μl
- Urządzenie do płukania płytek mikrotitracyjnych (manualne, pół-automatyczne lub zautomatyzowane)
- Czytnik ELISA z możliwością odczytu absorbancji przy długości fali 450 nm i jeśli to możliwe również przy długościach 620 - 650 nm
- Wytrząsarka mikropłytkowa (amplituda wytrząsania 3 mm; szybkość około. 600 rpm)
- Vortex

5. Pobranie próbki i jej przechowywanie

Surowica

Krew pobrać przez nakłucie żyły, pozostawić do skrzepnięcia, a następnie odseparować surowicę poprzez wirowanie w temperaturze pokojowej. Nie zaleca się wirowania materiału zanim kompletnie nie skrzepnie. Próbki pacjentów otrzymujących w ramach terapii antykoagulanty mogą wymagać dodatkowego czasu na krzepnięcie.

Próbki, które uległy hemolizie, są żółtaczkowe lub lipemiczne nie powinny być użyte do wykonania znaczenia (patrz punkt 2.2.1).

Przechowywanie: do 2 dni w temp. 2 – 8°C; w dłuższym okresie (do 6 miesięcy) przechowywać w temp. -20 °C.

Należy unikać powtarzających się cykli rozmrażania i zamrażania materiału.

6. Procedura testu

Należy pozwolić odczynnikom na osiągnięcie temperatury pokojowej, a następnie dokładnie je wymieszać odwracając naczynie do góry dnem. Zaleca się wykonanie oznaczeń w duplikatach. Zaleca się numerowanie pasków płytki mikrostudzienkowej przed użyciem, aby uniknąć pomyłki.

Stopień wiązania antysurowicy i koniugatu enzymu oraz aktywność samego enzymu zależą od temperatury. Im wyższa temperatura, tym wyższe będą wartości absorpcji. Różne czasy inkubacji będą miały podobny wpływ na absorbancję. Optymalny zakres temperatury podczas wykonywania testu to 20 – 25 °C.

⚠ *Korzystanie z wytrząsarki mikropłytkowej o następujących parametrach jest obowiązkowe: amplituda 3 mm; około. 600 obr./min. Użycie innych ustawień może wpłynąć na wyniki.*

6.1 Przygotowanie odczynników i dalsze uwagi

Bufor Płuczący (Wash Buffer)

Rozcieńczyć 20 ml koncentratu buforu płuczającego **WASH-CONC** **50X** za pomocą wody do objętości 1000 ml.

Przechowywanie: 2 miesiące w temp. 2 – 8 °C.

Chromogranin A Microtiter Strips (paski płytki opłaszczane przeciwciałami anty-Chromogranina A)

W rzadkich przypadkach pozostałości odczynnika blokującego i stabilizującego można zobaczyć w studzienkach jako małe, białe kropki lub linie. Pozostałości te nie mają wpływu na jakość produktu.

6.2 Przygotowanie próbek – rozcieńczanie

1. Próbkę surowicy należy rozcieńczyć 1:20 za pomocą **ASSAY-BUFF** np. 20 µl próbki surowicy + 400 µl **ASSAY-BUFF**.

Próbki surowicy spoza krzywej również należy odpowiednio rozcieńczyć przy użyciu **ASSAY-BUFF**.

6.3 Chromogranin A ELISA

1. Odpipetować po 50 µl standardów, kontroli i rozcieńczonych próbek do odpowiednich studzienek na paskach płytki testu Chromograniny A **U** i inkubować przez 1 h w temp. pokojowej (20 – 25 °C) w wytrząsarce (ok. 600 rpm).
2. Wylać lub zaaspirować zawartość studzienek. Przeplukać płytkę 4 razy dodając 300 µl buforu płuczającego (Wash Buffer), każdorazowo zlewając zawartość i osuszając płytkę, stukając płytką odwróconą do góry dnem o ręcznik papierowy.
3. Odpipetować po 50 µl koniugatu **CONJUGATE** do każdej ze studzienek i inkubować przez 1 h w temp. pokojowej (20 – 25 °C) w wytrząsarce (ok. 600 rpm).
4. Wylać lub zaaspirować zawartość studzienek. Przeplukać płytkę 4 razy dodając 300 µl buforu płuczającego (Wash Buffer), każdorazowo zlewając zawartość i osuszając płytkę, stukając płytką odwróconą do góry dnem o ręcznik papierowy.
5. Odpipetować po 100 µl **SUBSTRATE** do każdej ze studzienek.
6. Inkubować przez 25 ± 5 min w temp. pokojowej (20 – 25 °C) w wytrząsarce (ok. 600 rpm).
⚠ Unikać kontaktu z bezpośrednim światłem słonecznym!
7. Dodać po 100 µl roztworu zatrzymującego **STOP-SOLN** do każdej studzienki i krótko wstrząsnąć mikropłytką.
8. Wykonać odczyt absorbancji roztworu w studzienkach w ciągu 10 minut od zahamowania reakcji, za pomocą czytnika mikropłytkowego przy długości fali 450 nm (jeśli jest możliwość rekomenduje się także wykonać pomiar przy długości fali referencyjnej tj. pomiędzy 620 nm, a 650 nm).

7. Kalkulacja wyników

Zakres pomiaru	Chromogranina A w surowicy
	2.3 – 900 µg/l

Krzywą standardową uzyskuje się wykreślając odczyty absorbancji (oblicz średnią absorbancję) wzorców (liniowy, oś y) względem odpowiednich stężeń wzorców (logarytmiczne, oś x) przy użyciu stężenia 0,001 µg/l dla wzorca A (to wyrównanie jest obowiązkowe ze względu na logarytmiczna prezentacja danych). Do wyznaczenia krzywej należy użyć regresji nieliniowej do dopasowania krzywej (np. 4-parametrowa, marquardt).

Stężenia próbek i kontroli można odczytać bezpośrednio z krzywej standardowej.

Próbki, których stężenia są wyższe od najwyższych wartości standard (Standard E) powinny zostać rozcieńczone za pomocą buforu **ASSAY-BUFF** i ponownie oznaczone. Przy obliczaniu stężeń należy uwzględnić współczynnik rozcieńczenia.

7.1 Oczekiwane wartości referencyjne

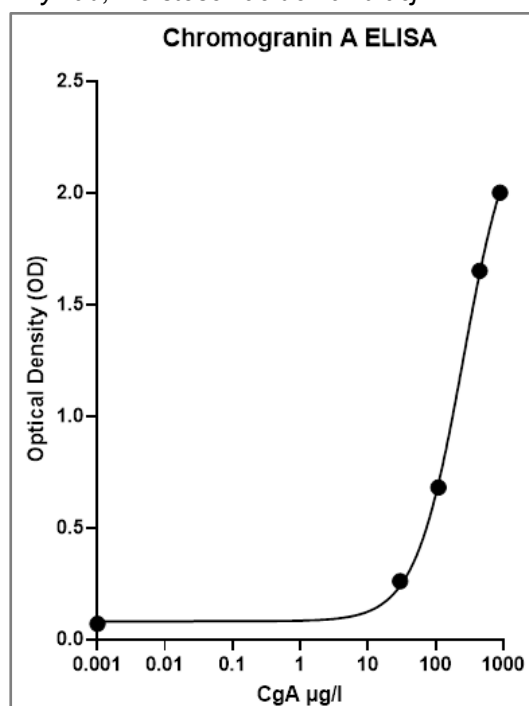
Zalecane jest, aby każde laboratorium określiło własne wartości referencyjne.

Oczekiwane wartości referencyjne podane poniżej są oparte na badaniach porównawczych z metodą B.R.A.H.M.S CgA Kryptor II. Oczekiwaną wartość referencyjną określono w badaniu van Treijena, M.J.C. i wsp. [7].

	Chromogranina A w surowicy
Oczekiwane wartości referencyjne	< 100 µg/l
Typowy zakres patologiczny	Aż do 143,500 µg/l

7.2 Typowa krzywa standardowa

⚠ Przykład, nie stosować do kalkulacji!



8. Kontrola jakości

Zaleca się użyć próbek kontrolne zgodnie z krajowymi przepisami. Stosować kontrole na poziomie zarówno normalnych, jak i wartości patologicznych. Komercyjnie dostępne próbki kontrolne należy traktować jak próbki o nieznanym stężeniu. Próbki kontrolne powinny mieścić się w ustalonych granicach ufności. Granice ufności dla kontroli zawartych w zestawie są wymienione w raporcie kontroli jakości (Raport –QC).

9. Charakterystyka testu

9.1 Wydajność

Czułość analityczna	
Limit dla próby ślepej (LOB)	0.9 µg/l
Limit detekcji (LOD)	1.4 µg/l
Limit oznaczalności (LOQ)	2.3 µg/l

Precyzja					
Intra-Assay (w obrębie zestawu)			Inter-Assay (pomiędzy zestawami)		
n = 12			n = 10		
Próbka	Średnia ± SD [µg/l]	CV [%]	Próbka	Średnia ± 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			

Seria do serii			
	Próbka	Średnia ± SD [µg/l]	CV [%]
Chromogranina A w surowicy (n = 3)	1	46.3 ± 2.3	5.1
	2	111 ± 7.2	6.5
	3	479 ± 61.8	12.9

Odzysk			
	Zakres [µg/l]	Średnia [%]	Zakres [%]
Chromogranina A	43.6 – 502	102	100 – 104

Liniowość			
	Seria rozcieńczeń do	Średnia [%]	Zakres [%]
Chromogranina A	1:64	92	91 – 96

Porównanie metody z B·R·A·H·M·S Kryptor CgA II	CgA ELISA = 1.05 x (Kryptor CgA II) – 15; R ² = 0.97; n = 57
--	---

Wydajność diagnostyczna GEP-NET [7]			
Specyficzność diagnostyczna [%]	Czułość diagnostyczna [%]	Pozytywna wartość predykcyjna (PPV) [%]	Negatywna wartość predykcyjna (PPV) [%]
83	56	87	49
Dodatni współczynnik prawdopodobieństwa (LR+)		Ujemny współczynnik prawdopodobieństwa (LR-)	
3.3		0.53	

9.2 Identyfikowalność metrologiczna

Wartości przypisane do standardów i kontroli testu Chromogranin A ELISA są zgodne z metodą referencyjną B.R.A.H.M.S CgA II Kryptor

Standardy i kontrole	Niepewność [%]
	7.5

Zestaw ELISA Chromogranina A	Rozszerzona niepewność [%] k = 2*
	16.5

* Definiuje przedział dotyczący zmierzonego wyniku, który będzie zawierał prawdziwą wartość z prawdopodobieństwem 95%.

10. Referencje/Literatura

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 gastroenteropancreatic 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.

Aby uzyskać więcej informacji na temat najnowszych danych literaturowych, należy skontaktować się z lokalnym dostawcą.

11. Zmiany

Wersja	Data wydania	Rozdział	Zmiana
18.0	2021-07-09	całość	– Rewizja testu ze względu na zmianę partii zastosowanej pary dopasowanych przeciwciał – instrukcja została zmieniona zgodnie z – rozporządzeniem IVDR (UE) 2017/746 – Rozcieńczenie próbki zmieniono z 1:8 na 1:20 (Rozdział 6.2) – Dodano typowy zakres patologiczny (rozdział 7.1) – Zmieniono charakterystykę testu (rozdział 9.1) – Partia do partii, a do charakterystyki testu dodano wydajność diagnostyczną – Dodano identyfikowalność metrologiczną (rozdział 9.2) – Zaktualizowano bibliografię/literaturę (rozdział 10)
19.0	2022-06-27	2.2.2	– Zaktualizowano wykaz leków, które mogą wpływać na poziom chromograniny – Zmiany redakcyjne
20.0	2023-03-20	7.1 9.1	– Dodano bardziej szczegółowy opis – Aktualizacja danych specyficzna dla serii
21.0	2023-11-06	4.1 9.1	– Zaktualizowano oznakowanie zagrożeń zgodnie z kartą charakterystyki – Zaktualizowano odzysk
22.0	2024-01-02	5	– Dostosowano przechowywanie próbek/stabilność
23.0	2024-08-07	4.1 7	– Oznakowanie zagrożeń zaktualizowane zgodnie z kartą charakterystyki – Uwaga dodana do współczynnika rozcieńczenia w obliczeniach

SYMBOLE

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Polski
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Oznakowanie CE
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Zapoznaj się z instrukcją
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Wyłącznie do diagnostyki in vitro!
	For research use only	Nur Forschungszwecke für	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Wyłącznie do celów badawczych
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	Nr katalogowy
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Nr partii
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <n> liczby znaczeń
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Środki ostrożności
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura przechowywania
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data ważności
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Wytwórca
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Dystrybowany przez
	Version	Version	Version	Versión	Wersja
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Jednorazowe użycie