



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 



IVD

CE

CHROMOGRANIN A - ELISA

CGA

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Read entire protocol before use.

CHROMOGRANIN A – ELISA

I. INTENDED USE

The CHROMOGRANIN A - ELISA test kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection and quantitation of chromogranin A in human plasma or serum. The results of the assay may be used as an aid in the diagnosis of chromogranin A secreting neuroendocrine tumours (NETs), such as pheochromocytomas and carcinoids. The assay is intended for use in patients with signs and symptoms consistent for NETs. It is not intended for screening a healthy population. The analysis should be performed by trained laboratory professionals.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name:** DIAsource CHROMOGRANIN A - ELISA
- B. Catalog number:** CGA: 96 tests
- C. Manufactured by:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact:
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

1. Biological activities

Chromogranins and secretogranins constitute a family of uniquely acidic proteins that are co-stored with neurotransmitters and peptide hormones in the brain and the diffuse neuroendocrine system (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). Structurally these proteins are products of different genes but share some overall properties such as an abundance of acidic amino acid residues and several pairs of basic amino acids as potential positions for post-translational cleavage. Chromogranins are co-stored and co-released with neuropeptides and hormones in the neuroendocrine cells throughout the body. A role for chromogranins in the generation of hormonal granules and package of hormones has been suggested. Furthermore, chromogranins can be cleaved into smaller fragments, which can display biological activities such as inhibition of hormonal release, vasodilatation and antimicrobial effects (Stridsberg M, 2000).

Tumours of neuroendocrine origin usually present with increased serum/plasma levels of chromogranin A (O'Connor, DT, Defetos LJ, 1986). The neuroendocrine tumours are derived from the neuroendocrine cells and typical neuroendocrine tumours are carcinoid tumours, pheochromocytomas, neuroblastomas, small cell lung cancers, hyperparathyroid adenomas, pituitary tumours and pancreatic islet tumours and including the MEN1 and MEN2 syndromes.

2. Clinical application


The clinical utility of chromogranin A has been investigated in an extensive amount of clinical trials and is now defined in a number of international guidelines (Pape U-F et al, 2012, Vinik et al, 2010 and Ramage, J. et al. 2012). These describe the role of chromogranin A in different phases of the patient management and it is stated that chromogranin A is an useful biomarker throughout the disease course of the patient:

- To assist with initial diagnosis and baseline testing
- To monitor disease progression

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

In a separate dilution plate patient samples, calibrators and controls are diluted 5x in Diluent containing biotin-labelled antibodies to Chromogranin A. The diluted material is transferred to the microtitre wells coated with streptavidin and incubated at room temperature for 60 minutes. During this first incubation a monoclonal antibody captures the chromogranin A to surface of the well. After washing to remove unbound material, a second horseradish peroxidase (HRP) labelled monoclonal antibody is added to detect the chromogranin A bound to the well. After incubation for 30 minutes, the wells are washed again and a colour substrate is added and incubated. The colour development is stopped after 15 minutes and the colour measured in a spectrophotometer. The colour is directly proportional to the amount of chromogranin A bound to the well. The amount of chromogranin is determined by comparison with the colour development of the calibrator samples. The calibrator in the kit is a synthetic peptide corresponding to chromogranin A. The peptide calibrator is set to give a response equal to a purified, native fragment of chromogranin A (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995).

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Reconstitution			
 Microtiterplate with streptavidin coated wells	96 wells	Ready for use			
<table border="1" data-bbox="65 813 331 853"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugate containing HRP-labelled antibodies to Chromogranin A. 100x concentrated	Ab	HRP	CONC	1 vial 150 µl	Dilute 100x with conjugate buffer
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="65 943 244 983"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Conjugate buffer + 0.01% gentamycine	CONJ	BUF	1 vial 15 ml	Ready for use	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="65 1048 244 1088"> <tr> <td>DIL</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Diluent containing biotin-labelled antibodies to Chromogranin A	DIL	BUF	1 vial 36 ml	Ready for use	
DIL	BUF				
<table border="1" data-bbox="65 1153 244 1193"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrators 1 to 6 containing human Chromogranin A in diluent. CAL 1 = 0 ng/mL (diluent), CAL 2 = 36 ng/mL, CAL 3 = 180 ng/mL, CAL 4 = 540 ng/mL, CAL 5 = 1080 ng/mL, CAL 6 = 1800 ng/mL.	CAL	N	6 vials lyophilized	Add 0.6 ml distilled water	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="65 1361 331 1402"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash Solution 20x concentrated	WASH	SOLN	CONC	1 vial 70 ml	Dilute 20x with distilled water
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="65 1444 244 1485"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls - N = 1 or 2	CONTROL	N	2 vials lyophilized	Add 0.6 ml distilled water	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="65 1527 244 1568"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)	CHROM	TMB	1 vial 15 ml	Ready for use	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="65 1632 244 1673"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Stop solution: 0.5M H ₂ SO ₄	STOP	SOLN	1 vial 15 ml	Ready for use	
STOP	SOLN				

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit

1. Microplate reader with 450 nm filter. Reference wavelength is 620 nm.
2. 300 µL/well dilution plate for dilution of calibrator, patient samples and controls.
3. Precision pipettes with disposable tips.
4. Automatic microtiter plate washer, absorbent tissue, tubes and a timer.

Before use

- Lyophilised calibrators and controls should be carefully dissolved with 600 µL distilled water. After use the reconstituted calibrators and controls should be stored at -20 °C or lower. Calibrators and controls may go through three freeze/thaw cycles without deterioration.

- Other reagents in the kit should be stored at 2-8 °C.
- Reconstituted calibrators and controls should be diluted 5x in diluent at each test occasion.
- The amount of conjugate needed for each analysis should be diluted 100x before use (10µL conjugate + 990 µL conjugate buffer per strip). Remaining diluted conjugate shall be discarded.
- Wash solution should be diluted 20x before use. Dilute 10 mL of the 20x concentrated wash solution in 190 mL distilled water. When stored at 2-8 °C, the diluted wash solution is stable until the date of expiration of the kit.
- The rest of the reagents in the kit are ready for use.
- Remove only the number of wells needed for testing, reseal the aluminum packaging carefully.

VIII. SPECIMEN COLLECTION

The CHROMOGRANIN A - ELISA is recommended for serum and heparin plasma samples.

Handle as if capable of transmitting infectious agents.

The samples are separated by centrifugation and can be stored at 2-8 °C up to 7 days. If samples are to be kept for longer periods, store at -20 °C or colder. Samples may go through three freeze/thaw cycles without deterioration.

Do not use a frost-free freezer because it may allow the specimens to go through freeze-thaw cycles and degrade antibody. Samples that are improperly stored or are subjected to multiple freeze-thaw cycles may yield spurious results.

IX. PROCEDURE

A. Handling notes

All solutions should be used at room temperature. Incubate all steps at room temperature (20-30 °C).

B. Procedure

Sample dilution and incubation

Dilute all samples 5x in a separate dilution plate before transferring to test plate. Calibrators, Low control, High control and patient plasma should all be diluted 50 µL plasma + 200 µL diluent.

Mix thoroughly by pipetting up and down before transferring 100µL in duplicate to the test plate according to the diagram below.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL5	P1									
B	CAL1	CAL5	P1									
C	CAL2	CAL6	P2									
D	CAL2	CAL6	P2									
E	CAL3	H	etc									
F	CAL3	H										
G	CAL4	L										
H	CAL4	L										

Incubate for 60 minutes.

After sample incubation

Aspirate and Wash three (3) times with 300 µL washing solution/well, filling and emptying the wells each time. After the last wash, empty the wells by tapping the microtiter plate on an absorbent tissue.

Adding conjugate

Add 100 µL conjugate to each well.
Incubate for 30 minutes.

After conjugate incubation

Wash as before.

Adding substrate solution

Add 100 µL substrate TMB to each well, incubate in the dark for 15 minutes. The incubation time may be shortened to 10 minutes if maximum Optical Density (OD) exceeds 3.0 at high temperatures or if an automated method is applied.

Adding stop solution

Add 100 µL stop solution to each well.
Read the absorbance at 450 nm within 2h on a microplate reader. Read at 620 nm as a reference wavelength.

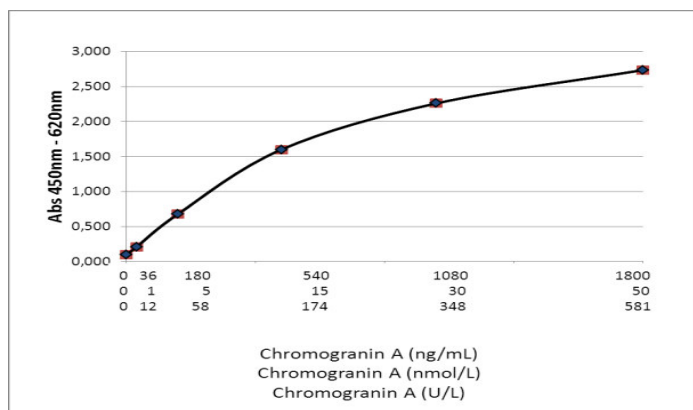
XI. CALCULATION OF RESULTS

Construct a calibrator curve by plotting the OD against the ng/mL values of the six calibrators. The six calibrators provided have values of 0 ng/mL for calibrator 1, 36 ng/mL for calibrator 2, 180 ng/mL for calibrator 3, 540 ng/mL for calibrator 4, 1080 ng/mL for calibrator 5, 1800 ng/mL for calibrator 6 respectively. Read the values of Low and High controls and the patient samples from the curve.

Values greater than the highest calibrator value should be reported as >1800 ng/mL, or diluted further with assay diluent and re-assayed. In this case the compensation for the dilution must be made in the calculation of the chromogranin A concentration. Please note, that in the event of calibrator 1 or calibrator 6 values out of range the test should be considered invalid and repeated.

For convenience concentrations can be calculated in ng/mL, nmol/L or U/L. All units are given in the table below. The molecular weight of the native fragment of chromogranin A (36kDa) was used for the conversion (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995).

Calibrator	Concentration			Absorbance
	ng/mL	nmol/L	U/L	
1	0	0	0	0.094
2	36	1	12	0.209
3	180	5	58	0.678
4	540	15	174	1.599
5	1080	30	348	2.259
6	1800	50	581	2.735



A sample with an absorbance value of 1.272 will read on the X-axis as having 367 ng/mL (or 10.2 nmol/L or 118 U/L) of chromogranin A. In this example a four parameter logistic curve fit has been applied.

Important: The curve is an example and should not be used for actual patient sample interpretation.

XII. PERFORMANCE

A. Sensitivity

The LOB (Limit of blank) was calculated by measuring the blank twenty-four times and was calculated as the mean + 3 standard deviations of the distribution of the test values. The LOB was calculated to be 2.24 ng/ml.

The LOD for serum samples (Limit of detection) was calculated as the LOB + 1.65 standard deviation of a low concentration sample tested in 10 different runs. The LOD was calculated to be 5.34 ng/ml for serum samples. The LOD was calculated to be 4.42 ng/ml for heparin plasma. The LOQ for serum samples (Limit of quantitation) was calculated by testing 5 samples of low values, 10 times. The LOQ was calculated to be 53.26 ng/ml.

Increased levels of chromogranin A can be found in patients with decreased renal function, patients with atrophic gastritis and patients with ongoing treatments with proton-pump inhibitory drugs.

B. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
1	24	90.3 ± 6.6	7.3	1	10	130.84 ± 9.87	7.5
2	24	333.8 ± 13.9	4.2	2	10	318.14 ± 24.6	7.7
3	24	620 ± 18.8	3	3	10	645.73 ± 42.33	6.6
4	24	906.9 ± 59.9	6.6	4	10	977.7 ± 34.03	3.5
-	-	-	-	5	10	125.81 ± 8.90	7.1
-	-	-	-	6	10	991.67 ± 68.48	6.9

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

C. Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Reagent Addition	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (O/E) (%)
1	-	82.0	-	-
	232.9	317.6	314.9	1.0
	426.3	536.4	508.3	1.1
2	-	207.8	-	-
	232.9	447.7	440.7	1.0
	426.3	663.1	634.1	1.0
3	-	149.1	-	-
	212.9	370.7	362.0	1.0
	393.2	558.0	542.3	1.0
4	-	367.3	-	-
	212.9	613.8	580.2	1.1
	393.2	815.8	760.5	1.1

DILUTION TEST

DILUTION TEST – serum samples				
Sample	Dilution	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (O/E) (%)
1	1/1	1194.6	-	-
	1/2	641.2	597.3	107
	1/4	290.4	298.7	97
	1/8	130.9	149.3	88
2	1/1	967	-	-
	1/2	472.3	483.5	98
	1/4	236.6	241.8	98
	1/8	125.3	120.9	104
3	1/1	1119.9	-	-
	1/2	562.3	560.0	100
	1/4	272.6	280.0	97
	1/8	130.3	140.0	93
4	1/1	993.6	-	-
	1/2	498.5	496.8	100
	1/4	241.1	248.4	97
	1/8	117.7	124.2	93

DILUTION TEST – heparin plasma samples				
Sample	Dilution	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (O/E) (%)
1	1/1	699.2	-	-
	1/2	326.3	349.6	93
	1/4	163.7	174.8	94
	1/8	83.8	87.4	96
2	1/1	701.6	-	-
	1/2	328.8	350.8	94
	1/4	154.7	175.4	88
	1/8	72.5	87.7	83
3	1/1	740.8	-	-
	1/2	321.0	370.4	87
	1/4	158.5	185.2	86
	1/8	82.9	92.6	90
4	1/1	676.5	-	-
	1/2	314.3	338.3	93
	1/4	154.6	169.1	91
	1/8	78.0	84.6	92

Samples were diluted with calibrator 1.

D. Hook effect.

No hook-effect is observed when testing chromogranin A concentrations up to 360 000 ng/mL (or 10 000 nmol/L or 116 000 U/L).

E. Specificity

No cross reactivity was detected when seven markers of neuroendocrine tumors, i.e 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), Neuron-specific enolase, Glucagon, Gastrin, Chromogranin B, Pancreatic polypeptide and Vasoactive intestinal polypeptide were analysed in the DIAsource Chromogranin A assay.

F. Interference

INTERFERENCES				
Sample	Interferant addition (ng/ml)	Without interferant (ng/ml)	Ratio (%)	Deviation (%)
Hemoglobin + 4.84 g/l				
1	124.6	136.6	91	9
2	301.4	319.8	94	6
3	527.8	540.1	98	2
4	719.3	768.2	94	6
Bilirubin unconjugated + 208 mg/l				
1	124.8	136.6	91	9
2	305.8	319.8	96	4
3	497.9	540.1	92	8
4	715.4	768.2	93	7
Triglyceride + 20 mg/ml				
1	124.2	136.6	91	9
2	307.5	319.8	96	4
3	489.5	540.1	91	9
4	735.1	768.2	96	4
Bilirubin conjugated + 200 mg/l				
1	124.6	136.6	91	9
2	311	319.8	94	6
3	510.3	540.1	98	2
4	752.4	768.2	94	6
Biotin + 10 ng/ml				
1	127.7	136.6	93	7
2	309.3	319.8	97	3
3	498.4	540.1	92	8
4	726.3	768.2	95	6

No detectable interference was confirmed with hemoglobin (4.84 g/l), bilirubin unconjugated (208 mg/l), triglycerides (20 mg/ml), bilirubin conjugated (200 mg/l) and biotin (10 ng/ml).

A high intake of biotin (in dietary supplements or drugs) may interfere with the assay and cause falsely low results.

G. Clinical sensitivity and specificity

Sensitivity

A total of 186 Heparin-plasma samples with clinical characterisation were assayed. The following table summarises the results

Disease groups	Total number	Positive >3.0 nmol/L	Negative ≤ 3.0 nmol/L	Sensitivity %
FGC, MGC	136	98	38	72
EPT	30	19	11	63
LC	9	4	5	44
NE Diff	6	2	4	33
ECL	4	3	1	75
Paragangliom	1	1	0	100

ECL = Enterochromaffin-like Tumours

EPT = Endocrine pancreas Tumour

FGC = Foregut carcinoid

LC = Lung carcinoid

MGC = Midgut carcinoid

NE Diff = Neurocrine differentiation

Specificity

56 Heparin-plasma samples from apparently healthy blood donors were assayed, 55 samples were negative:

55/56 = 98.2%

210 Serum samples from apparently healthy blood donors were assayed, 209 samples were negative:

209/210 = 99.5%

XIII. INTERNAL QUALITY CONTROL

The OD for calibrator 1 should be < 0.15

The OD for calibrator 6 should be > 1.0

The values of Low and High controls, see lot certificate.

The controls are intended to monitor for substantial reagent failure. If any of the control values are not within their respective ranges, the test should be considered invalid and should be repeated. Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organisations. Refer to NCCLS C24-A for guidance on appropriate QC practices.

XIV. REFERENCE INTERVALS

It is recommended that each laboratory establishes a reference range with samples commonly used since variations in sample handling may affect results. A strict sample handling routine as recommended above should be followed. The values given below are an indication of the expected reference range and calculated as the 97.5 percentile of 256 blood donor heparin plasma samples.

Reference range Heparin-plasma level of chromogranin A: 108 ng/mL (or 3.0 nmol/L or 35 U/L).

XV. LIMITATIONS

The individual patient's chromogranin A level cannot alone be used as a measure of disease severity. The test should not be relied upon as the sole basis of decisions on clinical therapy, but should be used in combination with clinical symptoms and the results of other available tests.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

For in vitro diagnostic use.

The assay reagents contain no human serum components but the patient plasmas analysed should be handled as if capable of transmitting infectious agents.

The Centres for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health recommend that potentially infectious agents be handled at the Biosafety Level 2.

Most of kit solutions contain ProClin 300 as a preservative. Never pipette by mouth or allow reagents or patient sample to come into contact with skin. Reagents containing ProClin 300 may be irritating. Avoid contact with skin and eyes. In case of contact, flush with plenty of water.

The stop solution contains 0.5 M sulphuric acid. Do not allow the reagent to get into contact with the skin.

The concentrations of chromogranin A in a given specimen determined with assays from different manufacturers can vary due to differences in assay methods and reagent specificity.

All the waste should be handled as hazardous wastes.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Ramage J et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoids) tumours (NETs) (Gut 2012; 61:6-32)
2. Pape U-F et al. ENETS Consensus Guidelines, Neuroendocrinology 2012;95:135-15
3. Vinik et al. NANETS Guidelines, Pancreas 2010; 39(6): 713-734
4. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. New England Journal of Medicine 1986, 314:1145-1151.
5. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K. Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments. Journal of Endocrinology 1993, 139:329-337.
6. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. Journal of Endocrinology 1995, 144:49-59.
7. Stridsberg, M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods. Advanced Experimental and Medical Biology 2000, 482:319-327.
8. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R. The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives. Neuroscience 1992, 49:497-528.

XVII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (μ l)	SAMPLE(S) CONTROLS (μ l)
Calibrators (1-6) Samples, Controls	100 -	- 100
Incubate for 60 min at room temperature. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 300 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Conjugate	100	100
Incubate for 30 min at room temperature. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 300 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 15 min at room temperature.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm)		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire l'intégralité du protocole avant utilisation.

CHROMOGRANINE A – ELISA

I. UTILISATION PRÉVUE

Le kit de test CHROMOGRANINE A - ELISA est un dosage avec immunoabsorbant lié à une enzyme (ELISA) conçu pour la détection et la quantification de la chromogranine A dans le plasma ou le sérum humain. Les résultats du dosage peuvent être utilisés pour aider à poser le diagnostic des tumeurs neuroendocrines (TNE) sécrétant de la chromogranine A, telles que les phéochromocytomes et les carcinoïdes. Le test est indiqué chez les patients présentant des signes et symptômes correspondant aux TNE. Le test n'est pas indiqué pour le dépistage des populations saines. La réalisation de cette analyse est exclusivement réservée aux professionnels de laboratoires qualifiés.

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. Nom:** DIAsource CHROMOGRANINE A - ELISA
- B. Numéro de référence :** CGA 96 tests
- C. Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou des renseignements sur les commandes, contacter :

Tél. : +32 (0) 10 84.99.11

Fax : +32 (0) 10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

1. Activités biologiques

Les chromogranines et les sécrétogranines constituent une famille de protéines particulièrement acides qui sont costockées avec les neurotransmetteurs et les hormones peptidiques dans le cerveau et le système neuroendocrinien diffus (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). D'un point de vue structurel, ces protéines sont les produits de différents gènes, mais elles disposent de certaines propriétés globales communes telles qu'une abondance de résidus d'acides aminés acides et plusieurs paires d'acides aminés basiques servant de positions potentielles pour le clivage post-traductionnel. Les chromogranines sont costockées et colibérées avec les neuropeptides et les hormones dans les cellules neuroendocrines de l'organisme. L'un des rôles des chromogranines peut résider dans la production de granules hormonaux et l'empaquetage d'hormones. En outre, les chromogranines peuvent être clivées en fragments de taille inférieure susceptibles de présenter des activités biologiques telles que l'inhibition de la libération hormonale, la vasodilatation et des effets anti-microbiologiques (Stridsberg M, 2000).

Les tumeurs d'origine endocrinienne s'accompagnent généralement de niveaux de chromogranine A élevés dans le sérum et le plasma (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). Les tumeurs neuroendocrines sont dérivées des cellules neuroendocrines et les tumeurs neuroendocrines typiques sont les carcinoïdes, les phéochromocytomes, les neuroblastomes, les cancers bronchiques à petites cellules, les adénomes parathyroïdiens, les tumeurs hypophysaires, et les tumeurs des îlots de Langerhans, y compris les syndromes MEN1 et MEN2.

2. Applications cliniques


L'utilité clinique de la chromogranine A a été étudiée dans un très grand nombre d'essais cliniques et elle est aujourd'hui définie dans de nombreuses directives internationales (Pape U-F et al, 2012, Vinik et al, 2010 et Ramage, J. et al. 2012). Celles-ci décrivent le rôle de la chromogranine A dans différentes phases de la prise en charge des patients et indiquent que la chromogranine A est un biomarqueur utile tout au long de l'évolution de la maladie du patient :

- pour aider à poser le diagnostic initial et dans le cadre des tests de référence ;
- pour surveiller la progression de la maladie.

IV. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Dans une plaque de dilution séparée, les échantillons de patients, les calibrateurs et les contrôles sont dilués 5x dans un diluant contenant des anticorps anti-chromogranine A marqués à la biotine. Le matériel dilué est transféré dans les puits de microtitration recouverts de streptavidine et incubé à température ambiante pendant 60 minutes. Lors de cette première incubation un anticorps monoclonal capture la chromogranine A à la surface du puits. À la suite d'un lavage destiné à supprimer la matière non liée, un second anticorps monoclonal marqué à la peroxydase de raifort (HRP) est ajouté pour détecter la chromogranine A liée au puits. Après une incubation de 30 minutes, les puits sont à nouveau lavés et un substrat coloré est ajouté et incubé. La réaction est interrompue au bout de 15 minutes et la coloration est mesurée par un spectrophotomètre. La coloration est directement proportionnelle à la quantité de chromogranine A liée au puits. La quantité de chromogranine est déterminée au moyen d'une comparaison avec la coloration des calibrateurs. Le calibrateur du kit est un peptide synthétique correspondant à la chromogranine A. Le calibrateur peptide est conçu pour donner une réponse égale à celle d'un fragment natif purifié de chromogranine A (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995).

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 tests Kit	Reconstitution			
 Plaque de microtitration tapissée de streptavidin	96 puits	Prêt à l'emploi			
<table border="1" data-bbox="71 831 331 869"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugué contenant des anticorps à la chromogranine A. marqués à la HRP. Concentré 100x	Ab	HRP	CONC	1 flacon 150 µl	Diluer 100 x avec un tampon de conjugué
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="71 958 245 996"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampon de conjugué + 0.01% gentamycine	CONJ	BUF	1 flacon 50 ml	Prêt à l'emploi	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="71 1070 245 1108"> <tr> <td>DIL</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Diluant contenant des anticorps à la chromogranine A marqués à la biotine	DIL	BUF	1 flacon 36 ml	Prêt à l'emploi	
DIL	BUF				
<table border="1" data-bbox="71 1182 245 1220"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrateurs 1 à 6 contenant de la chromogranine A humaine dans du diluant CAL 1 = 0 ng/mL (diluant), CAL 2 = 36 ng/mL, CAL 3 = 180 ng/mL, CAL 4 = 540 ng/mL, CAL 5 = 1080 ng/mL, CAL 6 = 1800 ng/mL.	CAL	N	6 flacons lyophilisés	Ajouter 0,6 ml d'eau distillée	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="71 1451 331 1489"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solution de lavage concentrée 20x	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 70 ml	Diluer 20 fois avec de l'eau distillée
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="71 1541 245 1579"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Contrôles - N = 1 ou 2	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Ajouter 0,6 ml d'eau distillée	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="71 1630 245 1668"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Solution TMB chromogène (tétraméthylbenzidine)	CHROM	TMB	flacon 15 ml	Prêt à l'emploi	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="71 1742 245 1780"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Solution d'arrêt : 0,5M H ₂ SO ₄	STOP	SOLN	1 flacon 15 ml	Prêt à l'emploi	
STOP	SOLN				

VI. MATÉRIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis, mais non fourni avec la trousse :

- Lecteur de microplaque avec filtre de 450 nm. Longueur d'onde de référence 620 nm.
- Plaque de microtitration de 300 µL/puits pour la dilution du calibrateur, des échantillons patient et des contrôles.
- Pipettes de précision à embouts jetables.
- Laveuse automatique de plaques de microtitration, papier absorbant, tubes et minuteur.

Avant emploi

- Les contrôles et calibrateurs lyophilisés devront être délicatement dissous dans 600 µL d'eau distillée. Après l'emploi, les contrôles et calibrateurs reconstitués devront être entreposés à une température de -20°C ou inférieure. Les contrôles et calibrateurs pourront être soumis à 3 cycles de congélation/décongélation sans détérioration.
- Les autres réactifs du kit devront être entreposés à une température comprise entre 2 et 8°C.
- Les contrôles et calibrateurs reconstitués devront être dilués 5 fois dans du diluant à l'occasion de chaque test.
- La quantité de conjugué nécessaire à chaque analyse devra être diluée 100 fois avant l'emploi (10 µL de conjugué + 990 µL de tampon de conjugué par bandelette). Jeter le reste de conjugué dilué.
- La solution de lavage devra être diluée 20 fois avant emploi. Diluer 10 ml la solution de lavage concentrée 20 fois dans 190 ml d'eau distillée. Lorsqu'elle est entreposée à une température comprise entre 2 et 8°C, la solution de lavage diluée reste stable jusqu'à la date de péremption du kit.
- Le reste des réactifs du kit sont prêts à l'emploi.
- Enlever uniquement le nombre de puits nécessaires à l'analyse en prenant soin de refermer soigneusement l'emballage en aluminium.

VIII. PRELEVEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Il est recommandé d'utiliser le kit de CHROMOGRANINE A - ELISA sur du plasma hépariné/sérum.

Manipuler comme susceptible de transmettre des agents infectieux.

Les échantillons sont séparés par centrifugation et peuvent être conservés à une température comprise entre 2 et 8°C pendant un maximum de 7 jours. Si les échantillons doivent être gardés plus longtemps, les entreposer à des températures de -20°C ou inférieures. Les échantillons pourront être soumis à 3 cycles de congélation/décongélation sans détérioration.

Ne pas utiliser de congélateur sans givre étant donné que ce genre de congélateur est susceptible d'exposer les spécimens à des cycles de congélation et décongélation consécutives et de dégrader l'anticorps. Les échantillons incorrectement entreposés ou ayant été exposés à plusieurs cycles de congélation et décongélation consécutives sont susceptibles de produire des résultats erronés.

IX. PROCÉDURE

A. Remarques concernant la manipulation

Toutes les solutions doivent être utilisées à température ambiante. Incuber toutes les étapes à température ambiante (20 à 30°C).

B. Procédure

Dilution et incubation des échantillons

Diluer 5 fois tous les échantillons dans une plaque de dilution séparée avant de les transférer sur la plaque d'analyse. Les calibrateurs, le contrôle bas (1), le contrôle haut (2) et le plasma de patient devront tous être dilués à raison de 50 µL plasma + 200 µL de diluant.

Mélanger soigneusement en pipettant vers le haut et le bas avant de transférer 100 µL, en duplicata, dans la plaque d'analyse et conformément au diagramme ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL5	P1									
B	CAL1	CAL5	P1									
C	CAL2	CAL6	P2									
D	CAL2	CAL6	P2									
E	CAL3	H	Etc									
F	CAL3	H										
G	CAL4	L										
H	CAL4	L										

Incuber pendant 60 minutes.

Après l'incubation de l'échantillon

Aspirer et laver trois (3) fois avec 300 µL de solution de lavage/puits, en remplissant et en vidant les puits à chaque fois. Après le dernier lavage, vider les puits en tapotant la microplaque sur du papier absorbant.

Ajout du conjugué

Ajouter 100 µL de conjugué à chaque puits. Incuber pendant 30 minutes.

Après incubation du conjugué

Laver selon les instructions ci-dessus.

Ajout de la solution de substrat

Ajouter 100 µL de substrat de TMB à chaque puits et incuber dans l'obscurité pendant 15 minutes.

La durée d'incubation peut être ramenée à 10 minutes si la DO (densité optique) maximum est supérieure à 3,0 à haute température ou si une méthode automatisée est appliquée.

Ajout de la solution d'arrêt

Ajouter 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits.

Lire l'absorbance à 450 nm dans les 2 heures qui suivent à l'aide d'un lecteur de microplaques. Lire à une longueur d'onde de référence de 620 nm.

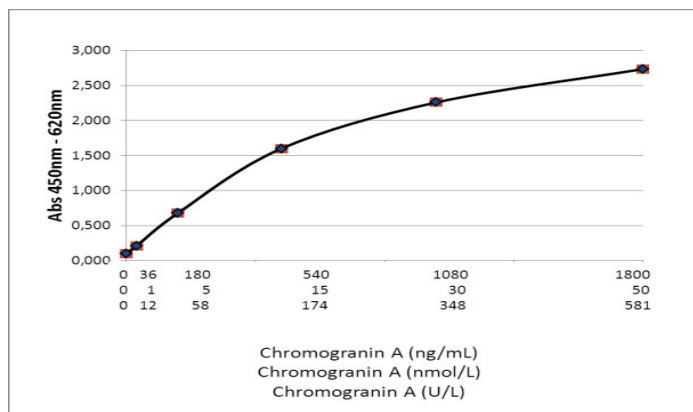
XI. CALCUL DES RÉSULTATS

Élaborer une courbe de calibration en reportant la DO par rapport aux valeurs ng/ml des six calibrateurs. Les six calibrateurs fournis ont respectivement des valeurs de 0 ng/mL pour le calibrateur 1, 36 ng/mL pour le calibrateur 2, 180 ng/mL pour le calibrateur 3, 540 ng/mL pour le calibrateur 4, 1080 ng/mL pour le calibrateur 5, 1800 ng/mL pour le calibrateur 6. Lire les valeurs du contrôle bas et du contrôle haut ainsi que les échantillons de patients à partir de la courbe.

Les valeurs supérieures à la valeur du calibrateur le plus élevé devront être relevées comme étant >1800 ng/mL, ou davantage diluées avec du diluant et réanalysées. Dans ce cas, il faudra compenser la dilution dans le cadre du calcul de la concentration de chromogranine A. Veuillez noter qu'en cas de valeurs hors limites du calibrateur 1 ou du calibrateur 6, le test doit être considéré comme invalide et répété.

Par commodité, les concentrations peuvent être calculées en ng/mL, nmol/L ou U/L. Toutes les unités figurent dans le tableau ci-dessous. Le poids moléculaire du fragment natif de chromogranine A (36kDa) a été utilisé pour la conversion (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995).

Calibrateur	Concentration			Absorbance
	ng/ml	nmol/L	U/L	
1	0	0	0	0,094
2	36	1	12	0,209
3	180	5	58	0,678
4	540	15	174	1,599
5	1080	30	348	2,259
6	1800	50	581	2,735



Un échantillon ayant une valeur d'absorbance de 1,272 apparaîtra sur l'axe des abscisses comme ayant 367 ng/mL (ou 10,2 nmol/L ou 118 U/L) de chromogranine A. Dans cet exemple, un ajustement de courbe logistique à 4 paramètres a été appliqué.

Important : Cette courbe est présentée à titre d'exemple et ne doit pas être utilisée pour l'interprétation des vrais échantillons de patients.

XII. PERFORMANCES

A. Sensibilité

La LOB (Limite du blanc) a été calculée en mesurant le blanc vingt-quatre fois et comme la moyenne + 3 écarts-types de la distribution des valeurs de test. La LOB a été calculée comme étant de 2,24 ng/ml.

La limite de détection (LOD) pour les échantillons de sérum a été calculée comme étant la LOB + 1,65 écart-type d'un échantillon à faible concentration testé dans 10 séries différentes.

La LOD a été calculée comme étant de 5,34 ng/ml pour les échantillons de sérum.

La LOD a été calculée comme étant de 4,42 ng/ml pour les échantillons de plasma hépariné.

La LOQ pour les échantillons de sérum (Limite de quantification) a été calculée en testant 5 échantillons de faibles valeurs, 10 fois. La LOQ a été calculée comme étant de 53,26 ng/ml.

Des hausses des niveaux de chromogranine A peuvent être notées chez des patients à la fonction rénale déficiente, les patients atteints de gastrite atrophique et les patients suivant un traitement continu de médicaments inhibiteurs de la pompe à protons.

B. Précision

INTRA ESSAI				INTER ESSAI			
Échantillon	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Échantillon	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
1	24	90.3 ± 6.6	7.3	1	10	130.84 ± 9.87	7.5
2	24	333.8 ± 13.9	4.2	2	10	318.14 ± 24.6	7.7
3	24	620 ± 18.8	3	3	10	645.73 ± 42.33	6.6
4	24	906.9 ± 59.9	6.6	4	10	977.7 ± 34.03	3.5
-	-	-	-	5	10	125.81 ± 8.90	7.1
-	-	-	-	6	10	991.67 ± 68.48	6.9

E-T : écart-type ; CV : coefficient de variation

C. Exactitude

TEST DE RÉCUPÉRATION

Échantillon	Ajout de réactif	Observé (ng/ml)	Attendu (ng/ml)	Récupération (O/A) (%)
1	-	82.0	-	-
	232.9	317.6	314.9	1.0
	426.3	536.4	508.3	1.1
	536.6	702.9	618.6	1.1
2	-	207.8	-	-
	232.9	447.7	440.7	1.0
	426.3	663.1	634.1	1.0
	536.6	846.6	744.4	1.1
3	-	149.1	-	-
	212.9	370.7	362.0	1.0
	393.2	558.0	542.3	1.0
	570.5	752.1	719.6	1.0
4	-	367.3	-	-
	212.9	613.8	580.2	1.1
	393.2	815.8	760.5	1.1
	570.5	999.2	937.8	1.1

TEST DE DILUTION

TEST DE DILUTION – échantillons de sérum				
Échantillon	Dilution	Observé (ng/ml)	Attendu (ng/ml)	Récupération (O/A) (%)
1	1/1	1194.6	-	-
	1/2	641.2	597.3	107
	1/4	290.4	298.7	97
	1/8	130.9	149.3	88
2	1/1	967	-	-
	1/2	472.3	483.5	98
	1/4	236.6	241.8	98
	1/8	125.3	120.9	104
3	1/1	1119.9	-	-
	1/2	562.3	560.0	100
	1/4	272.6	280.0	97
	1/8	130.3	140.0	93
4	1/1	993.6	-	-
	1/2	498.5	496.8	100
	1/4	241.1	248.4	97
	1/8	117.7	124.2	97

TEST DE DILUTION – échantillons de plasma hépariné				
Échantillon	Dilution	Observé (ng/ml)	Attendu (ng/ml)	Récupération (O/A) (%)
1	1/1	699.2	-	-
	1/2	326.3	349.6	93
	1/4	163.7	174.8	94
	1/8	83.8	87.4	96
2	1/1	701.6	-	-
	1/2	328.8	350.8	94
	1/4	154.7	175.4	88
	1/8	72.5	87.7	83
3	1/1	740.8	-	-
	1/2	321.0	370.4	87
	1/4	158.5	185.2	86
	1/8	82.9	92.6	90
4	1/1	676.5	-	-
	1/2	314.3	338.3	93
	1/4	154.6	169.1	91
	1/8	78.0	84.6	92

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur 1.

D. Effet crochet

Aucun effet crochet n'a été observé lors de l'analyse des concentrations de chromogranine A jusqu'à 360 000 ng/mL (ou 10 000 nmol/L ou 116 000 U/L).

E. Spécificité

Aucune réactivité croisée n'a été détectée lorsque sept marqueurs des tumeurs neuroendocrines, notamment l'acide 5-hydroxy-indole-acétique (5-HIAA), l'énolase spécifique aux neurones, le glucagon, la gastrine, la chromogranine B, le polypeptide pancréatique et le polypeptide vasoactif intestinal, ont été analysés à l'aide du dosage DIAsource Chromogranine A.

F. Interférence

INTERFERENCES				
Échantillon	Ajout interférant (ng/ml)	Sans interférant (ng/ml)	Ratio (%)	Deviation (%)
Hémoglobine + 4.84 g/l				
1	124.6	136.6	91	9
2	301.4	319.8	94	6
3	527.8	540.1	98	2
4	719.3	768.2	94	6
Bilirubine non conjuguée + 208 mg/l				
1	124.8	136.6	91	9
2	305.8	319.8	96	4
3	497.9	540.1	92	8
4	715.4	768.2	93	7
Triglycéride + 20 mg/ml				
1	124.2	136.6	91	9
2	307.5	319.8	96	4
3	489.5	540.1	91	9
4	735.1	768.2	96	4
Bilirubin conjuguée + 200 mg/l				
1	124.6	136.6	91	9
2	311	319.8	94	6
3	510.3	540.1	98	2
4	752.4	768.2	94	6
Biotine + 10 ng/ml				
1	127.7	136.6	93	7
2	309.3	319.8	97	3
3	498.4	540.1	92	8
4	726.3	768.2	95	6

Aucune interférence n'a été détectée avec l'hémoglobine (4,84 g/L), la bilirubine non conjuguée (208 mg/L), des triglycérides (20 mg/ml), de la bilirubine conjuguée (200 mg/l) et de la biotine (10 ng/ml).

Une consommation élevée de biotine (dans les compléments alimentaires ou les médicaments) peut interférer avec le test et entraîner des résultats faussement bas.

G. Sensibilité et spécificité cliniques

Sensibilité

Un total de 186 échantillons de plasma hépariné avec caractérisation clinique ont été analysés. Le tableau ci-dessous récapitule les résultats obtenus

Groupes pathologiques	Nombre total	Positif >3,0 nmol/L	Négatif ≤ 3,0 nmol/L	Sensibilité %
FGC, MGC	136	98	38	72
TEP	30	19	11	63
LC	9	4	5	44
Diff NE	6	2	4	33
ECL	4	3	1	75
Paraganglionnaire	1	1	0	100

ECL = Tumeurs à cellules entérochromaffine

TEP = Tumeur endocrine pancréatique

FGC = Carcinoïde de l'intestin antérieur

LC = Carcinoïde du poumon

MGC = Carcinoïde de l'intestin moyen

NE Diff = Différenciation neurocrine

Spécificité

Sur 56 échantillons de plasma hépariné analysés provenant de donneurs apparemment sains, 55 étaient négatifs :

55/56 = 98,2 %

Sur les 210 échantillons de sérum analysés provenant de donneurs apparemment sains, 209 étaient négatifs :

209/210 = 99,5 %

XIII. CONTROLE QUALITÉ INTERNE

La DO du calibrateur 1 doit être < 0,15

La DO du calibrateur 6 doit être > 1,0

Voir le certificat de lot pour ce qui concerne les valeurs du contrôle haut et du contrôle bas.

Les contrôles sont destinés à surveiller les risques de défaillance importante des réactifs. Si une quelconque des valeurs contrôles ne se trouve pas dans sa plage respective, le test devra être considéré comme non valable et devra être recommencé. Des contrôles supplémentaires pourront être testés conformément aux directives ou exigences réglementaires locales, fédérales ou nationales, ou émanant d'organismes d'accréditation. Consulter la norme NCCLS C24-A pour y consulter les directives relatives aux pratiques de contrôle qualité.

XIV. INTERVALLES DE RÉFÉRENCE

Il est conseillé à chaque laboratoire d'établir sa propre plage de référence avec des échantillons communément utilisés étant donné que les variations de manipulation sont susceptibles d'influer sur les résultats. De strictes pratiques routinières de manipulation d'échantillons devront être observées conformément aux recommandations ci-dessus. Les valeurs indiquées ci-dessous donnent une indication de la plage de référence prévue et sont calculées pour correspondre au percentile 97,5 de 256 échantillons de plasma hépariné de donneurs de sang.

Niveau de plage de référence du plasma hépariné de la chromogranine

A : 108 ng/mL (ou 3,0 nmol/L ou 35 U/L).

XV. LIMITATIONS

Le niveau de chromogranine A du patient individuel ne peut pas à lui seul être considéré représentatif de la gravité de la maladie. Il n'est pas prudent de se fier uniquement à ce test pour prendre des décisions thérapeutiques cliniques. Il devra plutôt être utilisé en parallèle avec les symptômes cliniques et les résultats d'autres analyses disponibles.

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Pour l'utilisation en diagnostic in vitro.

Les réactifs du dosage ne contiennent pas d'éléments de sérum humain, mais lors de la manipulation des plasmas de patient analysés, il sera nécessaire de considérer ces derniers comme susceptibles de transmettre des agents infectieux.

Les centres de contrôle et prévention des pathologies, et les instituts nationaux concernés par les affaires de santé conseillent de manipuler les agents potentiellement infectieux selon le niveau 2 de biosécurité.

La plupart des solutions du kit contiennent l'agent de conservation ProClin 300. Ne jamais pipetter à la bouche ou laisser des réactifs ou échantillons de patients entrer en contact avec la peau. Les réactifs contenant du ProClin 300 sont potentiellement irritants. Éviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer abondamment à l'eau. La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique 0,5 M. Ne pas laisser le réactif entrer en contact avec la peau.

Les concentrations de chromogranine A d'un spécimen donné déterminées par dosages en provenance de fabricants différents peuvent varier en raison des différences entre les méthodes de dosage et la spécificité des réactifs.

Manipuler et gérer tous les déchets en tant que déchets dangereux.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. Ramage J et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoids) tumours (NETs) (Gut 2012;61:6-32)
2. Pape U-F et al. ENETS Consensus Guidelines, Neuroendocrinology 2012;95:135-15
3. Vinik et al. NANETS Guidelines, Pancreas 2010; 39(6): 713-734
4. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. New England Journal of Medicine 1986, 314:1145-1151.
5. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K. Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments. Journal of Endocrinology 1993, 139:329-337.
6. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. Journal of Endocrinology 1995, 144:49-59.
7. Stridsberg, M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods. Advanced Experimental and Medical Biology 2000, 482:319-327.
8. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R. The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives. Neuroscience 1992, 49:497-528.

XVII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	CALIBRATEURS (µl)	ÉCHANTILLON(S) CONTRÔLES (µl)
Calibrateurs (1-6) Échantillons / Contrôles	100 -	- 100
Incuber pendant 60 minutes à température ambiante. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 300 µl de solution de lavage et aspirer.		
Conjugué	100	100
Incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 300 µl de solution de lavage et aspirer.		
Solution chromogène	100	100
Incuber pendant 15 minutes à température ambiante.		
Solution d'arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de microplaques et consigner l'absorbance de chaque puits à 450 nm (par rapport à 630 ou 650 nm).		

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

CHROMOGRANIN A – ELISA

I. BESTIMMUNGSGEMÄSSE VERWENDUNG

Das CHROMOGRANIN A – ELISA-Testkit ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Chromogranin A in menschlichem Blutplasma oder -serum. Die Ergebnisse des Tests können als Hilfsmittel bei der Diagnose von Chromogranin A sezernierenden neuroendokrinen Tumoren (NETs), wie Phäochromozytomen und Karzinoiden, verwendet werden. Der Assay ist für die Verwendung bei Patienten mit Anzeichen und Symptomen, die auf NETs hindeuten, vorgesehen. Er ist nicht für das Screening einer gesunden Population gedacht. Die Analyse sollte von geschultem Laborpersonal durchgeführt werden.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

A. Handelsbezeichnung: DIAsource CHROMOGRANIN A – ELISA

B. Katalognummer: CGA: 96 Tests

C. Hersteller: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellinformationen wenden Sie sich bitte an:

Tel.: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. KLINISCHER HINTERGRUND

1. Biologische Aktivität

Chromogranine und Sekretogranine bilden eine Familie einzigartiger saurer Proteine, die zusammen mit Neurotransmittern und Peptidhormonen in das Gehirn und das diffuse neuroendokrine System eingelagert werden (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R. 1992). Strukturell stammen diese Proteine zwar von unterschiedlichen Genen, aber sie teilen manche allgemeinen Eigenschaften, haben eine Reihe von Aminosäuren gemeinsam und mehrere Paare basischer Aminosäuren als potentielle Positionen für post-translationale Gruppierungen. Chromogranine werden zusammen mit Neuropeptiden und Hormonen in den neuroendokrinen Zellen des gesamten Körpers gespeichert und gemeinsam mit diesen freigesetzt. Es wird vermutet, dass Chromogranine eine Rolle bei der Bildung von Hormonkörnchen und -paketen spielt. Weiterhin können Chromogranine in kleinere Fragmente gespalten werden, die auch biologische Aktivitäten zeigen können, wie die Hemmung der Hormonfreisetzung, Gefäßerweiterung und antimikrobielle Effekte (Stridsberg M, 2000).

Tumoren neuroendokrinen Ursprungs weisen in der Regel erhöhte Serum-/Plasmakonzentrationen von Chromogranin A auf (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). Die neuroendokrinen Tumoren werden von den neuroendokrinen Zellen gebildet. Beispiele für typische neuroendokrine Tumoren sind Krebstumoren, Phäochromozytome, Neuroblastome, kleinzellige Lungenkarzinome, hyperparathyreoidale Adenome, Hypophysentumoren und Inselzelltumoren des Pankreas sowie die MEN1- und MEN2-Syndrome.

2. Klinische Anwendung

Der klinische Nutzen von Chromogranin A wurde in einer Vielzahl von klinischen Studien untersucht und ist nun in einer Reihe von internationalen Leitlinien definiert (Pape U-F et al, 2012, Vinik et al, 2010 und Ramage, J. et al. 2012). Darin wird die Rolle von Chromogranin A in verschiedenen Phasen des Patientenmanagements beschrieben und es wird festgestellt, dass Chromogranin A ein nützlicher Biomarker im gesamten Krankheitsverlauf des Patienten ist:

- Um die Erstdiagnose und Baseline-Tests zu unterstützen
- Um die Krankheitsprogression zu überwachen

IV. GRUNDSÄTZE DER METHODE

In einer separaten Verdünnungsplatte werden Patientenproben, Kalibratoren und Kontrollen 5-fach in Verdünnungsmittel verdünnt, der Antikörper mit Biotin-Markierung gegen Chromogranin A enthält. Das verdünnte Material wird in die mit Streptavidin beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatte übertragen und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser ersten Inkubation bindet ein monoklonaler Antikörper das Chromogranin A an die Oberfläche der Kavität. Nach dem Waschen zur Entfernung von nicht gebundenem Material wird ein zweiter, mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierter monoklonaler Antikörper hinzugefügt, um das in der Kavität gebundene Chromogranin A nachzuweisen. Nach 30 Minuten Inkubation werden die Kavitäten erneut gewaschen und ein Farbsubstrat wird zugegeben und inkubiert. Die Farbentwicklung wird nach 15 Minuten gestoppt und die Farbe mit einem Spektralphotometer gemessen. Die Farbe ist direkt proportional zur Menge des in der Kavität gebundenen Chromogranin A. Die Menge an Chromogranin wird durch Vergleich mit der Farbentwicklung der Kalibratorproben bestimmt. Der Kalibrator im Kit ist ein synthetisches Peptid, das Chromogranin A entspricht. Der Peptid-Kalibrator ist so eingestellt, dass er eine Reaktion erzeugt, die einem gereinigten, nativen Fragment von Chromogranin A entspricht (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995).

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests Kit	Rekonstitution			
 Mikrotiterplatte mit Streptavidin beschichteten Kavitäten	96 Kavitäten	Gebrauchsfertig			
<table border="1" data-bbox="67 943 331 981"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Konjugat mit HRP markierten Antikörpern gegen Chromogranin A. 100-fach konzentriert	Ab	HRP	CONC	1 Fläschchen 150 µl	40-fach mit Konjugatpuffer verdünnen
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="67 1070 242 1108"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Konjugatpuffer + 0,01 % Gentamycin	CONJ	BUF	1 Fläschchen 15 ml	Gebrauchsfertig	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="67 1153 242 1191"> <tr> <td>DIL</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Verdünnungsmittel mit Biotin markierten Antikörpern gegen Chromogranin A	DIL	BUF	1 Fläschchen 36 ml	Gebrauchsfertig	
DIL	BUF				
<table border="1" data-bbox="67 1281 242 1319"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibratoren 1 bis 6 enthalten humanes Chromogranin A in Verdünnungsmittel. CAL 1 = 0 ng/ml (Verdünnungsmittel), CAL 2 = 36 ng/ml, CAL 3 = 180 ng/ml, CAL 4 = 540 ng/ml, CAL 5 = 1.080 ng/ml, CAL 6 = 1.800 ng/ml.	CAL	N	6 Fläschchen lyophilisiert	0,6 ml destilliertes Wasser hinzufügen	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="67 1482 331 1520"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Waschlösung 20-fach konzentriert	WASH	SOLN	CONC	1 Fläschchen 70 ml	20-fach mit destilliertem Wasser verdünnen
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="67 1572 242 1610"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrollen - N = 1 oder 2	CONTROL	N	2 Fläschchen lyophilisiert	0,6 ml destilliertes Wasser hinzufügen	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="67 1662 242 1700"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Chromogene TMB-Lösung (Tetramethylbenzidin)	CHROM	TMB	1 Fläschchen 15 ml	Gebrauchsfertig	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="67 1751 242 1789"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Stopplösung: 0.5M H ₂ SO ₄	STOP	SOLN	1 Fläschchen 15 ml	Gebrauchsfertig	
STOP	SOLN				

VI. NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert

1. Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450 nm Filter. Die Referenzwellenlänge beträgt 620 nm.
2. Verdünnungsplatte mit 300 µl/Kavität für die Verdünnung von Kalibrator, Patientenproben und Kontrollen.
3. Präzisionspipetten mit Einwegspitzen.
4. Automatisches Waschergerät für Mikrotiterplatten, saugfähige Tücher, Röhrchen und ein Timer.

Vor Gebrauch

- Lyophilisierte Kalibratoren und Kontrollen sollten vorsichtig mit 600 µl destilliertem Wasser aufgelöst werden. Nach dem Gebrauch sollten die rekonstituierten Kalibratoren und Kontrollen bei -20 °C oder niedriger gelagert werden. Kalibratoren und Kontrollen können drei Gefrier-/Auftauzyklen überstehen, ohne Schaden zu nehmen.
- Andere Reagenzien des Kits sollten bei 2–8 °C gelagert werden.
- Rekonstituierte Kalibratoren und Kontrollen sollten bei jedem Test 5-fach in Verdünnungsmittel verdünnt werden.
- Die für jede Analyse benötigte Konjugatmenge sollte vor der Verwendung 100-fach verdünnt werden (10 µl Konjugat + 990 µl Konjugatpuffer pro Streifen). Das restliche verdünnte Konjugat wird entsorgt.
- Die Waschlösung sollte vor der Verwendung 20-fach verdünnt werden. Verdünnen Sie 10 ml der 20-fach konzentrierten Waschlösung in 190 ml destilliertem Wasser. Bei 2–8 °C gelagert, ist die verdünnte Waschlösung bis zum Verfallsdatum des Kits stabil.
- Die restlichen Reagenzien des Kits sind gebrauchsfertig.
- Nehmen Sie nur die Anzahl der Kavitäten heraus, die Sie für den Test benötigen, und verschließen Sie die Aluminiumverpackung wieder sorgfältig.

VIII. PROBENENTNAHME

Der CHROMOGRANIN A – ELISA wird für Serum- und Heparin-Plasmaproben empfohlen.

Proben so handhaben, als könnten sie Infektionserreger übertragen.

Die Proben werden durch Zentrifugieren getrennt und können bei 2–8 °C bis zu 7 Tage aufbewahrt werden. Wenn die Proben länger aufbewahrt werden sollen, lagern Sie sie bei -20 °C oder kälter. Die Proben können drei Gefrier-/Auftauzyklen durchlaufen, ohne zu verderben.

Verwenden Sie keinen frostfreien Gefrierschrank, da die Proben dann möglicherweise Gefrier-/Auftauzyklen durchlaufen und der Antikörper abgebaut wird. Proben, die unsachgemäß gelagert oder mehreren Gefrier-/Auftauzyklen unterzogen werden, können zu falschen Ergebnissen führen.

IX. VERFAHREN

A. Hinweise zur Handhabung

Alle Lösungen sollten bei Raumtemperatur verwendet werden. Alle Schritte bei Raumtemperatur (20–30 °C) inkubieren.

B. Verfahren

Probenverdünnung und Inkubation

Verdünnen Sie alle Proben 5-fach in einer separaten Verdünnungsplatte, bevor Sie sie auf die Testplatte übertragen. Kalibratoren, niedrige Kontrolle, hohe Kontrolle und Patientenplasma sollten alle mit 50 µl Plasma + 200 µl Verdünnungsmittel verdünnt werden.

Durch Auf- und Abpipettieren gründlich mischen, bevor Sie 100 µl in doppelter Ausführung auf die Testplatte übertragen, wie in der Abbildung unten dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL5	P1									
B	CAL1	CAL5	P1									
C	CAL2	CAL6	P2									
D	CAL2	CAL6	P2									
E	CAL3	H	etc.									
F	CAL3	H										
G	CAL4	L										
H	CAL4	L										

60 Minuten lang inkubieren.

Nach Inkubation der Probe

Drei (3) Mal mit 300 µl Waschlösung/Vertiefung absaugen und waschen, wobei Sie die Kavitäten jedes Mal füllen und leeren. Nach dem letzten Waschvorgang leeren Sie die Kavitäten, indem Sie die Mikrotiterplatte auf ein saugfähiges Tuch klopfen.

Zugabe des Konjugats

Geben Sie 100 µl Konjugat in jede Kavität. 30 Minuten lang inkubieren.

Nach Inkubation des Konjugats

Wie zuvor waschen.

Zugabe der Substratlösung

Geben Sie 100 µl Substrat TMB in jede Kavität und inkubieren Sie 15 Minuten im Dunkeln.

Die Inkubationszeit kann auf 10 Minuten verkürzt werden, wenn die maximale optische Dichte (OD) bei hohen Temperaturen 3,0 übersteigt oder wenn eine automatisierte Methode angewendet wird.

Zugabe der Stopplösung

100 µl Stopplösung in jede Kavität geben.

Die Absorption bei 450 nm innerhalb von 2 Stunden auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten. Lesen Sie bei 620 nm als Referenzwellenlänge ab.

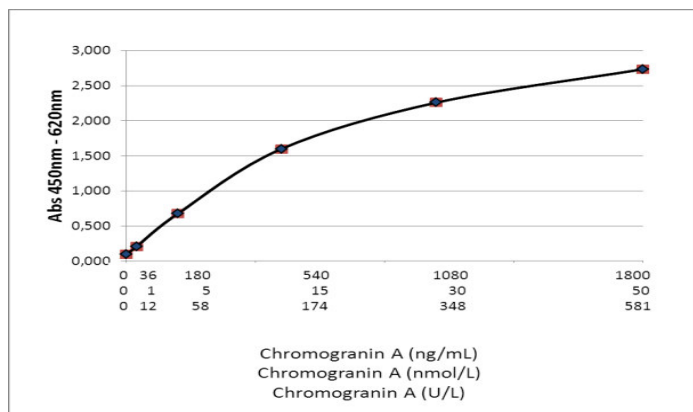
XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Erstellen Sie eine Kalibrierkurve durch Auftragen der OD gegen die ng/ml-Werte der sechs Kalibratoren. Die sechs mitgelieferten Kalibratoren haben Werte von 0 ng/ml für Kalibrator 1, 36 ng/ml für Kalibrator 2, 180 ng/ml für Kalibrator 3, 540 ng/ml für Kalibrator 4, 1080 ng/ml für Kalibrator 5 und 1800 ng/ml für Kalibrator 6. Lesen Sie die Werte der niedrigen und hohen Kontrollen und der Patientenproben aus der Kurve ab.

Werte, die über dem höchsten Kalibratorwert liegen, sollten als > 1.800 ng/ml verzeichnet oder mit Assay-Verdünnungsmittel weiter verdünnt und erneut gemessen werden. In diesem Fall muss die Verdünnung bei der Berechnung der Chromogranin A-Konzentration ausgeglichen werden. Bitte beachten Sie, dass der Test als ungültig betrachtet und wiederholt werden sollte, wenn die Werte von Kalibrator 1 oder Kalibrator 6 außerhalb des Bereichs liegen.

Der Einfachheit halber können die Konzentrationen in ng/ml, nmol/l oder U/l berechnet werden. Alle Einheiten sind in der Tabelle unten angegeben. Das Molekulargewicht des nativen Fragments von Chromogranin A (36kDa) wurde für die Umrechnung verwendet (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995).

Kalibrator	Konzentration			Absorption
	ng/ml	nmol/l	U/l	
1	0	0	0	0,094
2	36	1	12	0,209
3	180	5	58	0,678
4	540	15	174	1,599
5	1080	30	348	2,259
6	1800	50	581	2,735



Eine Probe mit einem Absorptionswert von 1,272 wird auf der X-Achse als 367 ng/ml (oder 10,2 nmol/l oder 118 U/l) Chromogranin A angezeigt. In diesem Beispiel wurde eine logistische Kurvenanpassung mit vier Parametern angewendet.

Wichtig: Die Kurve ist ein Beispiel und sollte nicht für die Interpretation der tatsächlichen Patientenproben verwendet werden.

XII. LEISTUNG

A. Sensitivität

Die LoB (höchste Leerwertmessung) wurde durch 24-maliges Messen des Leerwerts berechnet und als die mittleren + 3 Standardabweichungen der Verteilung der Testwerte ermittelt. Die LoB wurde mit 2,24 ng/ml berechnet. Die LoD für Serumproben (Detektionsschwelle) wurde als die LoB + 1,65 Standardabweichung einer Probe mit niedriger Konzentration berechnet, die in 10 verschiedenen Durchläufen getestet wurde. Die LoD wurde mit 5,34 nmol/l für Serumproben berechnet. Die LoD wurde mit 4,42 nmol/l für Heparinplasma berechnet. Die LoQ für Serumproben

(Quantifizierungsschwelle) wurde berechnet, indem 5 Proben von geringen Werten 10 Mal getestet wurden. Die LoD wurde mit 53,26 ng/ml berechnet.

Erhöhte Chromogranin-A-Spiegel können bei Patienten mit verminderter Nierenfunktion, Patienten mit atrophischer Gastritis und Patienten mit laufenden Behandlungen mit Protonenpumpenhemmern vorkommen.

B. Präzision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
1	24	90,3 ± 6,6	7,3	1	10	130,84 ± 9,87	7,5
2	24	333,8 ± 13,9	4,2	2	10	318,14 ± 24,6	7,7
3	24	620 ± 18,8	3	3	10	645,73 ± 42,33	6,6
4	24	906,9 ± 59,9	6,6	4	10	977,7 ± 34,03	3,5
-	-	-	-	5	10	125,81 ± 8,90	7,1
-	-	-	-	6	10	991,67 ± 68,48	6,9

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

C. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugabe der Reagenzien	Beobachtet (ng/ml)	Erwartet (ng/ml)	Wiederfindung (O/E) (%)
1	-	82,0	-	-
	232,9	317,6	314,9	1,0
	426,3	536,4	508,3	1,1
2	536,6	702,9	618,6	1,1
	-	207,8	-	-
	232,9	447,7	440,7	1,0
3	426,3	663,1	634,1	1,0
	536,6	846,6	744,4	1,1
	-	149,1	-	-
4	212,9	370,7	362,0	1,0
	393,2	558,0	542,3	1,0
	570,5	752,1	719,6	1,0
5	-	367,3	-	-
	212,9	613,8	580,2	1,1
	393,2	815,8	760,5	1,1
6	570,5	999,2	937,8	1,1

VERDÜNNUNGSTEST

VERDÜNNUNGSTEST – Serumproben				
Probe	Verdünnung	Beobachtet (ng/ml)	Erwartet (ng/ml)	Wiederfindung (O/E) (%)
1	1/1	1194,6	-	-
	1/2	641,2	597,3	107
	1/4	290,4	298,7	97
	1/8	130,9	149,3	88
2	1/1	967	-	-
	1/2	472,3	483,5	98
	1/4	236,6	241,8	98
	1/8	125,3	120,9	104
3	1/1	1119,9	-	-
	1/2	562,3	560,0	100
	1/4	272,6	280,0	97
	1/8	130,3	140,0	93
4	1/1	993,6	-	-
	1/2	498,5	496,8	100
	1/4	241,1	248,4	97
	1/8	117,7	124,2	

VERDÜNNUNGSTEST – Heparin-Plasmaproben				
Probe	Verdünnung	Beobachtet (ng/ml)	Erwartet (ng/ml)	Wiederfindung (O/E) (%)
1	1/1	699,2	-	-
	1/2	326,3	349,6	93
	1/4	163,7	174,8	94
	1/8	83,8	87,4	96
2	1/1	701,6	-	-
	1/2	328,8	350,8	94
	1/4	154,7	175,4	88
	1/8	72,5	87,7	83
3	1/1	740,8	-	-
	1/2	321,0	370,4	87
	1/4	158,5	185,2	86
	1/8	82,9	92,6	90
4	1/1	676,5	-	-
	1/2	314,3	338,3	93
	1/4	154,6	169,1	91
	1/8	78,0	84,6	92

Die Proben wurden mit Kalibrator 1 verdünnt.

D. Hook-Effekt

Beim Testen von Chromogranin A-Konzentrationen bis zu 360.000 ng/ml (oder 10.000 nmol/l oder 116.000 U/l) wird kein Hook-Effekt beobachtet.

E. Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt, als sieben Marker neuroendokriner Tumoren, d. h. 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA), neuronspezifische Enolase, Glucagon, Gastrin, Chromogranin B, Pankreaspolypeptid und vasoaktives intestinales Polypeptid im DIAsource Chromogranin A Assay analysiert wurden.

F. Interferenz

INTERFERENZEN				
Probe	Zugabe einer Störsubstanz (ng/ml)	Ohne Störsubstanz (ng/ml)	Verhältnis (%)	Abweichung (%)
Hämoglobin + 4,84 g/l				
1	124,6	136,6	91	9
2	301,4	319,8	94	6
3	527,8	540,1	98	2
4	719,3	768,2	94	6
Bilirubin unkonjugiert + 208 mg/l				
1	124,8	136,6	91	9
2	305,8	319,8	96	4
3	497,9	540,1	92	8
4	715,4	768,2	93	7
Triglycerid + 20 mg/ml				
1	124,2	136,6	91	9
2	307,5	319,8	96	4
3	489,5	540,1	91	9
4	735,1	768,2	96	4
Bilirubin konjugiert + 200 mg/l				
1	124,6	136,6	91	9
2	311	319,8	94	6
3	510,3	540,1	98	2
4	752,4	768,2	94	6
Biotin + 10 ng/ml				
1	127,7	136,6	93	7
2	309,3	319,8	97	3
3	498,4	540,1	92	8
4	726,3	768,2	95	6

Es wurde keine nachweisbare Interferenz bei Hämoglobin (4,84 g/l), Bilirubin unkonjugiert (208 mg/l), Triglyceriden (20 mg/ml), Bilirubin konjugiert (200 mg/l) und Biotin (10 ng/ml) festgestellt.

Eine hohe Aufnahme von Biotin (in Nahrungsergänzungsmitteln oder Medikamenten) kann den Test beeinträchtigen und zu falsch niedrigen Ergebnissen führen.

G. Klinische Sensitivität und Spezifität

Sensitivität

Insgesamt wurden 186 Heparin-Plasmaproben mit klinischer Charakterisierung untersucht. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen:

Krankheitsgruppen	Gesamtzahl	Positiv > 3,0 nmol/l	Negativ ≤ 3,0 nmol/l	Sensitivität %
FGC, MGC	136	98	38	72
EPT	30	19	11	63
LC	9	4	5	44
NE Diff	6	2	4	33
ECL	4	3	1	75
Paragangliom	1	1	0	100

ECL = Enterochromaffin-ähnliche Tumoren

EPT = Endokriner Pankreastumor

FGC = Vorderdarmkarzinoid

LC = Lungenkarzinoid

MGC = Mitteldarmkarzinoid

NE Diff = Neurokrine Differenzierung

Spezifität

56 Heparin-Serumproben von scheinbar gesunden Blutspendern wurden getestet, 55 waren negativ:

55/56 = 98,2 %

210 Serumproben von scheinbar gesunden Blutspendern wurden getestet, 209 waren negativ:

209/210 = 99,5 %

XIII. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Die OD für Kalibrator 1 sollte < 0,15 sein.

Die OD für Kalibrator 6 sollte > 1,0 sein.

Die Werte der niedrigen und hohen Kontrollen, siehe Chargenzertifikat.

Die Kontrollen dienen der Überwachung auf ein wesentliches Reagenzienversagen. Wenn einer der Kontrollwerte nicht innerhalb des jeweiligen Bereichs liegt, sollte der Test als ungültig betrachtet und wiederholt werden. Zusätzliche Kontrollen können gemäß den Leitlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher und/oder bundesstaatlicher Vorschriften oder Akkreditierungsorganisationen getestet werden. Siehe NCCLS C24-A für Hinweise zu geeigneten Verfahren zur Qualitätskontrolle.

XIV. REFERENZINTERVALLE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor einen Referenzbereich mit üblicherweise verwendeten Proben festlegt, da Abweichungen in der Probenhandhabung die Ergebnisse beeinflussen können. Es sollte eine strenge Probenhandhabungsroutine wie oben empfohlen eingehalten werden. Die unten angegebenen Werte sind ein Hinweis auf den erwarteten Referenzbereich und wurden als 97,5 Perzentil von 256 Heparin-Plasmaproben von Blutspendern berechnet.

Referenzbereich Heparin-Plasmaspiegel von Chromogranin A: 108 ng/ml (oder 3,0 nmol/l oder 35 U/l).

XV. EINSCHRÄNKUNGEN

Der Chromogranin A-Spiegel des einzelnen Patienten kann nicht allein als Maß für den Schweregrad der Erkrankung verwendet werden. Der Test sollte nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen über die klinische Therapie dienen, sondern in Kombination mit klinischen Symptomen und den Ergebnissen anderer verfügbarer Tests verwendet werden.

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Zur In-vitro-Diagnostik.

Die Testreagenzien enthalten keine Bestandteile von Humanserum, aber die analysierten Patientenplasmen sollten so gehandhabt werden, als könnten sie Infektionserreger übertragen.

Das Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten und die nationalen Gesundheitsinstitute empfehlen, dass potenziell infektiöse Agenzien auf Biologischer Schutzstufe 2 gehandhabt werden sollten.

Die meisten Kit-Lösungen enthalten ProClin 300 als Konservierungsmittel. Pipettieren Sie niemals mit dem Mund und lassen Sie Reagenzien oder

Patientenproben nicht mit der Haut in Kontakt kommen. Reagenzien, die ProClin 300 enthalten, können eine Reizwirkung haben. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Bei Kontakt mit viel Wasser ausspülen.

Die Stopplösung enthält 0,5 M Schwefelsäure. Achten Sie darauf, dass das Reagenz nicht mit der Haut in Berührung kommt.

Die Konzentrationen von Chromogranin A in einer bestimmten Probe, die mit Assays verschiedener Hersteller bestimmt wurden, können aufgrund von Unterschieden in den Assay-Methoden und der Spezifität der Reagenzien variieren.

Alle Abfälle sollten als gefährlicher Abfall behandelt werden.

XVII. LITERATUR

1. Ramage J et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoids) tumours (NETs) (Gut 2012; 61:6-32)
2. Pape U-F et al. ENETS Consensus Guidelines, Neuroendocrinology 2012;95:135-15
3. Vinik et al. NANETS Guidelines, Pancreas 2010; 39(6): 713-734
4. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J.
Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms.
New England Journal of Medicine 1986, 314:1145-1151.
5. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K.
Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments.
Journal of Endocrinology 1993, 139:329-337.
6. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G.
Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours.
Journal of Endocrinology 1995, 144:49-59.
7. Stridsberg, M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods.
Advanced Experimental and Medical Biology 2000, 482:319-327.
8. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R.
The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives.
Neuroscience 1992, 49:497-528.

XVII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN (µl)	PROBE(N) KONTROLLEN (µl)
Kalibratoren (1–6) Proben, Kontrollen	100 -	- 100
60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Inhalt aus jeder Kavität absaugen. 3 Mal mit 300 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Konjugat	100	100
30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Inhalt aus jeder Kavität absaugen. 3 Mal mit 300 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Chromogene Lösung	100	100
15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.		
Stopplösung	100	100
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und die Absorption jeder Kavität bei 450 nm (gegenüber 630 nm oder 650 nm) verzeichnen.		

Andere Übersetzungen dieser Gebrauchsanweisung können von unserer Website heruntergeladen werden: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Leggere integralmente il protocollo prima dell'uso.

ELISA per CROMOGRANINA A

I. DESTINAZIONE D'USO

Il kit per il test ELISA per CHROMOGRANINA A è un test immuno-adsorbente legato a un enzima (ELISA) per rilevare e quantificare la cromogranina A nel plasma o siero umano. I risultati del test possono essere usati come supporto nella diagnosi della cromogranina A secreta da tumori neuroendocrini (NETs), come feocromocitomi e carcinoidi. Il test è destinato all'uso su pazienti con segni e sintomi consistenti di NETs. Non è destinato allo screening della popolazione sana.

L'analisi va effettuata da parte di professionisti di laboratori con adeguata preparazione.

II. INFORMAZIONI GENERALI

- A. Nome brevettato:** DIAsource ELISA per CROMOGRANINA A
- B. Numero di catalogo :** CGA: 96 test
- C. Fabbricato da :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet , 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

Per assistenza tecnica o per informazioni sull'ordinazione, contattare:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. RETROSCENA CLINICO

1. Attività biologiche

La cromogranina e la secretogranina sono una famiglia di proteine unicamente acide co-stoccate insieme a neurotrasmettitori e ormoni peptide diffuse nel cervello e nel sistema neuroendocrino (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). A livello strutturale, queste proteine sono prodotti di diversi geni ma condividono alcune proprietà generali, come l'abbondanza dei residui di amminoacidi e diverse parti di amminoacidi di base come potenziali posizioni per la scissione post-traduzionale. Le cromogranine sono co-stoccate e co-rilasciate con neuropeptidi e ormoni nelle cellule neuroendocrine nell'organismo. È stato suggerito un ruolo delle cromogranine nella generazione di granuli ormonali e pacchetti di ormoni. Inoltre, le cromogranine possono essere scisse in frammenti più piccoli che possono visualizzare le attività biologiche, come l'inibizione del rilascio ormonale, la vasodilatazione e gli effetti anti-microbiologici (Stridsberg M, 2000).

I tumori di origine neuroendocrina solitamente si presentano con livelli aumentati di siero/plasma di cromogranina A (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). I tumori neuroendocrini sono derivati dalle cellule neuroendocrine e i tumori neuroendocrini tipici sono tumori carcinoidi, feocromocitomi, neuroblastomi, cancro del polmone a piccole cellule, adenomi iperparatiroidismo, tumori dell'ipofisi e tumori all'isola pancreatica, comprese le sindromi MEN1 e MEN2.

2. Applicazione clinica


L'utilità clinica della cromogranina A è stata esplorata in un numero ampio di test clinici e ora è definita in una serie di linee guide internazionali (Pape U-F et al, 2012, Vinik et al, 2010 and Ramage, J. et al. 2012). Questi descrivono il ruolo della cromogranina A in diverse fasi della gestione paziente e affermano che la cromogranina A è un utile marcatore lungo il decorso del morbo del paziente:

- Per assistere la diagnosi iniziale e il test di base
- Per monitorare questo progresso

IV. PRINCIPI DEL METODO

In una piastra per diluizione separata, campioni, calibratori e controlli del paziente sono diluiti 5x nel diluente che contiene anticorpi marcati con biotina per la cromogranina A. Il materiale diluito viene trasferito ai pozzetti per microtitolazione rivestiti con streptavidina e incubati a temperatura ambiente per 60 minuti. Nella prima incubazione, un anticorpo monoclonale cattura la cromogranina A sulla superficie del pozzetto. Dopo il lavaggio per rimuovere il materiale non legato, un secondo anticorpo perossidasi di rafano (HRP) etichettato monoclonale è aggiunto per rilevare la cromogranina A legata al pozzetto. Dopo un'incubazione di 30 minuti, i pozzetti sono nuovamente lavati e viene aggiunto un substrato colorato e incubato. Lo sviluppo del colore è fermato dopo 15 minuti e il colore misurato in uno spettrofotometro. Il colore è direttamente proporzionale alla quantità di cromogranina A legata al pozzetto. La quantità di cromogranina è stabilita dal confronto con lo sviluppo del colore dei campioni di calibratore. Il calibratore nel kit è un peptide sintetico corrispondente alla cromogranina A. Il peptide calibratore è impostato in modo da dare una risposta uguale ad un frammento purificato, nativo di cromogranina A (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995).

V. REAGENTI FORNITI

Reagenti	96 test Kit	Ricostruzione			
 Piastra per microtitolazione con pozzetti rivestiti con streptavidina	96 pozzetti	Pronto all'uso			
<table border="1" data-bbox="65 860 331 898"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Coniugato contenente anticorpi marcati HRP per la cromogranina A. concentrazione 100x.	Ab	HRP	CONC	1 fiala 150 µl	Diluire 100x con tampone coniugato
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="65 987 244 1025"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampone coniugato + gentamicina 0,01%	CONJ	BUF	1 fiala 15 ml	Pronto all'uso	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="65 1093 244 1131"> <tr> <td>DIL</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Diluente contenente anticorpi biotina per cromogranina A	DIL	BUF	1 fiala 36 ml	Pronto all'uso	
DIL	BUF				
<table border="1" data-bbox="65 1198 244 1236"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibratori da 1 a 6 contenenti cromogranina umana A nel diluente. CAL 1 = 0 ng/mL (diluente), CAL 2 = 36 ng/mL, CAL 3 = 180 ng/mL, CAL 4 = 540 ng/mL, CAL 5 = 1080 ng/mL, CAL 6 = 1800 ng/mL.	CAL	N	6 fiale liofilizzato	Aggiungere 0,6 ml di acqua distillata	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="65 1406 331 1444"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Soluzione di lavaggio, concentrazione 20x	WASH	SOLN	CONC	1 fiala 70 ml	Diluire 20x con acqua distillata
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="65 1512 244 1550"> <tr> <td>CONTROLLO</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlli - N = 1 o 2	CONTROLLO	N	2 fiale liofilizzato	Aggiungere 0,6 ml di acqua distillata	
CONTROLLO	N				
<table border="1" data-bbox="65 1594 244 1632"> <tr> <td>CROMO</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Soluzione cromogenica TMB (tetrametilbenzidine)	CROMO	TMB	1 fiala 15 ml	Pronto all'uso	
CROMO	TMB				
<table border="1" data-bbox="65 1700 244 1738"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Soluzione stop: 0.5M H ₂ SO ₄	STOP	SOLN	1 fiala 15 ml	Pronto all'uso	
STOP	SOLN				

VI. NON IN DOTAZIONE

Il seguente materiale è necessario ma non fornito con il kit

1. Lettore micropiastra con filtro 450 nm. La lunghezza d'onda di riferimento è 620 nm.
2. Piastra diluente 300 µL/pozzetto per diluire calibratore, campioni e controlli del paziente.
3. Pipette di precisione con punte usa e getta.
4. Sistema di lavaggio automatico piastra microtitolazione, tessuto assorbente, tubi e un timer.

Prima dell'uso

- Calibratori e controlli liofilizzati devono essere sciolti accuratamente con 600 µL di acqua distillata. Dopo l'uso, i calibratori e controlli ricostituiti devono essere conservati a -20 °C o a temperature inferiori. I calibratori e i controlli possono attraversare tre cicli di congelamento/scongelo senza deterioramenti.
- Altri reagenti nel kit vanno conservati a 2-8 °C.
- I calibratori e i controlli ricostituiti vanno diluiti 5x nel diluente ad ogni occasione di test.
- La quantità di coniugato necessaria per ogni analisi deve essere diluita 100x prima dell'uso (10µL coniugato + 990 µL tampone per striscia). Il coniugato diluito restante va scartato.
- La soluzione di lavaggio deve essere diluita 20x prima dell'uso. Diluire 10 mL della soluzione di lavaggio concentrata 20x in 190 mL di acqua distillata. Se conservata a 2-8 °C, la soluzione di lavaggio diluita è stabile fino alla data di scadenza del kit.
- Il resto dei reagenti nel kit sono pronti all'uso.
- Rimuovere soltanto il numero di pozzetti necessari per test, ri-sigillare la confezione di alluminio con cura.

VIII. RACCOLTA DI CAMPIONI

ELISA per CROMOGRANINA A è raccomandato per campioni di siero ed eparina-plasma.

Maneggiare come se fosse in grado di trasmettere gli agenti infettanti.

I campioni sono separati dalla centrifuga e possono essere conservati a 2-8 °C fino a 7 giorni. Se i campioni vanno conservati per periodi più lunghi, conservare a -20 °C o a temperature inferiori. I campioni possono attraversare tre cicli di congelamento/scongelo senza deterioramenti. Non usare freezer senza congelamento perché potrebbe comportare cicli di congelamento e scongelamento dei campioni provocando un deterioramento dell'anticorpo. I campioni conservati in modo inadeguato o soggetti a cicli multipli di congelamento/scongelo possono portare a risultati falsi.

IX. PROCEDURA

A. Note sulla manipolazione

Tutte le soluzioni vanno usate a temperatura ambiente. Incubare tutte le fasi a temperatura ambiente (20-30 °C).

B. Procedura

Diluizione e incubazione del campione

Diluire tutti i campioni 5x in una piastra di diluizione separata prima del trasferimento alla piastra del test. Calibratori, bassi controlli, alti controlli e plasma del paziente vanno tutti diluiti 50 µL di plasma + 200 µL diluente. Miscelare a fondo pipettando su e giù prima di trasferire 100µL sul duplicato della piastra del test secondo il diagramma qui sotto.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL5	P1									
B	CAL1	CAL5	P1									
C	CAL2	CAL6	P2									
D	CAL2	CAL6	P2									
E	CAL3	H	ecc									
F	CAL3	H										
G	CAL4	L										
H	CAL4	L										

Incubare per 60 minuti.

Dopo l'incubazione del campione

Aspirare e lavare tre (3) volte con 300 µL di soluzione di lavaggio/pozzetto, riempire e svuotare i pozzetti ogni volta. Dopo l'ultimo lavaggio, svuotare i pozzetti battendo la piastra per microtitolazione su un tessuto assorbente.

Aggiunta di coniugati

Aggiungere 100 µL di coniugato a ogni pozzetto. Incubare per 30 minuti.

Dopo l'incubazione del coniugato

Lavare come indicato sopra.

Aggiunta di soluzione substrato

Aggiungere 100 µL di substrato TMB a ogni pozzetto, incubare al buio per 15 minuti.

Il tempo di incubazione può essere abbreviato a 10 minuti se la densità ottica (OD) supera 3.0 ad alte temperature o se si applica un metodo automatico.

Aggiunta soluzione stop

Aggiungere 100 µL di soluzione stop a ogni pozzetto. Leggere l'assorbanza a 450 nm entro 2h su un lettore micropiastra. Leggere a 620 nm come lunghezza d'onda di riferimento.

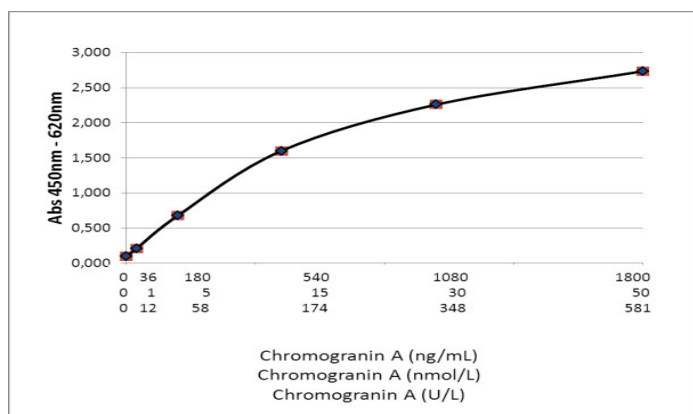
XI. CALCOLO DEI RISULTATI

Creare una curva calibratore registrando OD rispetto ai valori ng/mL dei sei calibratori. I sei calibratori forniti hanno valori di 0 ng/mL per il calibratore 1, 36 ng/mL per il calibratore 2, 180 ng/mL per il calibratore 3, 540 ng/mL per il calibratore 4, 1080 ng/mL per il calibratore 5, 1800 ng/mL per il calibratore 6 rispettivamente. Leggere i valori dei controlli alto e basso e i campioni del paziente dalla curva.

I valori superiori al massimo valore del calibratore devono essere riferiti come >1800 ng/mL, oppure ulteriormente diluiti con diluente del test e ri-analizzati. In questo caso, la compensazione per la diluizione deve essere effettuata nel calcolo della concentrazione di cromogranina A. Si noti che nel caso di valori del calibratore 1 o calibratore 6 fuori dall'intervallo occorrerà considerare non valido il test e ripeterlo.

Per comodità, le concentrazioni possono essere calcolate in ng/mL, nmol/L or U/L. Tutte le unità sono indicate nella tabella sotto. Il peso molecolare del frammento nativo di cromogranina A (36kDa) è stato usato per la conversione (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995).

Calibratore	Concentrazione			Assorbanza
	ng/mL	nmol/L	U/L	
1	0	0	0	0,094
2	36	1	12	0,209
3	180	5	58	0,678
4	540	15	174	1,599
5	1080	30	348	2,259
6	1800	50	581	2,735



Un campione con valore di assorbanza di 1.272 sull'asse X risulterà con 367 ng/mL (o 10.2 nmol/L o 118 U/L) di cromogranina A. In questo esempio è stata applicata una curva logistica a quattro parametri.

Importante: La curva è esemplificativa e non deve essere usata per interpretare il vero campione del paziente.

XII. PERFORMANCE

A. Sensibilità

Il LOB (limite di assenza) è stato calcolato misurando i vuoti 20 volte ed è stato calcolato come media + 3 scarti quadratici standard della distribuzione dei valori del test. Il LOB calcolato è 2,24 ng/ml.

Il LOD (limite di rilevamento) per i campioni di siero è stato calcolato come LOB + 1.65 scarti quadratici standard di un campione a bassa concentrazione testato in 10 diverse fasi. Il LOD calcolato è 5,34 ng/ml per i campioni di siero. Il LOD calcolato è 4,42 ng/ml per eparina-plasma. Il LOQ (limite di quantificazione) per campioni di siero è stato calcolato testando 5 campioni di basso valore 10 volte. Il LOQ calcolato è 53,26 ng/ml.

Livelli maggiori di cromogranina A si possono riscontrare in pazienti con funzione renale ridotta, pazienti con gastrite atrofica e pazienti con terapie in corso con farmaci inibitori della pompa protonica.

B. Precisione

INTRA-TEST				INTER-TEST			
Campione	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Campione	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
1	24	90,3 ± 6,6	7,3	1	10	130,84 ± 9,87	7,5
2	24	333,8 ± 13,9	4,2	2	10	318,14 ± 24,6	7,7
3	24	620 ± 18,8	3	3	10	645,73 ± 42,33	6,6
4	24	906,9 ± 59,9	6,6	4	10	977,7 ± 34,03	3,5
-	-	-	-	5	10	125,81 ± 8,90	7,1
-	-	-	-	6	10	991,67 ± 68,48	6,9

SD: Deviazione Standard; CV: Coefficiente di variazione

C. Precisione

CONTROLLO DI RECUPERO

Campione	Aggiunta del reagente	Osservato (ng/ml)	Atteso (ng/ml)	Recupero (O/A) (%)
1	-	82,0	-	-
	232,9	317,6	314,9	1,0
	426,3	536,4	508,3	1,1
2	536,6	702,9	618,6	1,1
	-	207,8	-	-
	232,9	447,7	440,7	1,0
3	426,3	663,1	634,1	1,0
	536,6	846,6	744,4	1,1
	-	149,1	-	-
4	212,9	370,7	362,0	1,0
	393,2	558,0	542,3	1,0
	570,5	752,1	719,6	1,0
5	-	367,3	-	-
	212,9	613,8	580,2	1,1
	393,2	815,8	760,5	1,1
6	570,5	999,2	937,8	1,1

PROVA DILUIZIONE

PROVA DILUIZIONE – campioni di siero				
Campione	Diluizione	Osservato (ng/ml)	Previsto (ng/ml)	Recupero (O/A) (%)
1	1/1	1194,6	-	-
	1/2	641,2	597,3	107
	1/4	290,4	298,7	97
	1/8	130,9	149,3	88
2	1/1	967	-	-
	1/2	472,3	483,5	98
	1/4	236,6	241,8	98
	1/8	125,3	120,9	104
3	1/1	1119,9	-	-
	1/2	562,3	560,0	100
	1/4	272,6	280,0	97
	1/8	130,3	140,0	93
4	1/1	993,6	-	-
	1/2	498,5	496,8	100
	1/4	241,1	248,4	97
	1/8	117,7	124,2	97

PROVA DI DILUIZIONE – campioni di eparina-plasma				
Campione	Diluizione	Osservato (ng/ml)	Atteso (ng/ml)	Recupero (O/A) (%)
1	1/1	699,2	-	-
	1/2	326,3	349,6	93
	1/4	163,7	174,8	94
	1/8	83,8	87,4	96
2	1/1	701,6	-	-
	1/2	328,8	350,8	94
	1/4	154,7	175,4	88
	1/8	72,5	87,7	83
3	1/1	740,8	-	-
	1/2	321,0	370,4	87
	1/4	158,5	185,2	86
	1/8	82,9	92,6	90
4	1/1	676,5	-	-
	1/2	314,3	338,3	93
	1/4	154,6	169,1	91
	1/8	78,0	84,6	92

I campioni sono stati diluiti con il calibratore 1.

D. Effetto Hook.

Non è stato osservato alcun effetto hook durante il test della concentrazione di cromogranina A fino a 360 000 ng/mL (o 10 000 nmol/L o 116 000 U/L).

E. Specificità

Non sono state rilevate reattività incrociate quando sette marcatori di tumori neuroendocrini, ad es. acido 5-idrossi-indolacetico (5-HIAA), enolasi neurone specifica, glucagone, gastrina, cromogranina B, polipeptide pancreatico e polipeptide intestinale vasoattivo sono stati analizzati nel test DIASource della cromogranina A.

F. Interferenza

Campione	Aggiunta interferenza (ng/ml)	INTERFERENZE		
		Senza interferenza (ng/ml)	Rapporto (%)	Deviazione (%)
Emoglobina + 4,84 g/l				
1	124,6	136,6	91	9
2	301,4	319,8	94	6
3	527,8	540,1	98	2
4	719,3	768,2	94	6
Bilirubina non coniugata + 208 mg/l				
1	124,8	136,6	91	9
2	305,8	319,8	96	4
3	497,9	540,1	92	8
4	715,4	768,2	93	7
Trigliceridi + 20 mg/ml				
1	124,2	136,6	91	9
2	307,5	319,8	96	4
3	489,5	540,1	91	9
4	735,1	768,2	96	4
Bilirubina coniugata + 200 mg/l				
1	124,6	136,6	91	9
2	311	319,8	94	6
3	510,3	540,1	98	2
4	752,4	768,2	94	6
Biotina + 10 ng/ml				
1	127,7	136,6	93	7
2	309,3	319,8	97	3
3	498,4	540,1	92	8
4	726,3	768,2	95	6

Non sono state confermate interferenze rilevabili con l'emoglobina (4.84 g/l), la bilirubina non coniugata (208 mg/l), i trigliceridi (20 mg/ml), la bilirubina coniugata (200 mg/l) e la biotina (10 ng/ml).

Un elevato apporto di biotina (con integratori alimentari o farmaci) può interferire con il test e provocare risultati falsamente bassi.

G. Sensibilità clinica e specificità

Sensibilità

Sono stati testati in tutto 186 campioni di eparina-plasma con caratterizzazione clinica. La seguente tabella riassume i risultati

Gruppi patologie	Numero totale	Positivo >3.0 nmol/L	Negativo ≤ 3.0 nmol/L	Sensibilità %
FGC, MGC	136	98	38	72
EPT	30	19	11	63
LC	9	4	5	44
NE Diff	6	2	4	33
ECL	4	3	1	75
Paraganglioma	1	1	0	100

ECL = tumori simil-enterocromaffini

EPT = tumore endocrino al pancreas

FGC = carcinome dalla porzione cefalica dell'intestino primitivo

LC = carcinome polmonare

MGC = carcinome porzione mediana dell'intestino primitivo

NE Diff = differenziazione neuroendocrina

Specificità

Sono stati testati 56 campioni di eparina-plasma da donatori di sangue apparentemente sani, 55 campioni sono risultati negativi:

55/56 = 98,2%

Sono stati testati 210 campioni di siero da donatori di sangue apparentemente sani, 209 campioni sono risultati negativi:

209/210 = 99,5%

XIII. CONTROLLO INTERNO DI QUALITÀ

OD per calibratore 1 deve essere > 0.15

OD per calibratore 6 deve essere > 1.0

Per i valori dei controlli alto e basso, v. certificato del lotto.

I controlli sono destinati al monitoraggio di sostanziale fallimento del reagente. Se qualcuno dei controlli non è entro l'intervallo dato, il test va considerato non valido e deve essere ripetuto. Possono essere testati altri controlli secondo le linee guida o i requisiti delle norme locali, statali e/o federali o di organizzazioni accreditate. Consultare NCCLS C24-A per un riferimento sulle pratiche QC adeguate.

XIV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire un intervallo di riferimento con campioni comunemente usati in quanto la variazione nella manipolazione del campione può incidere sui risultati. Seguire una rigida routine di manipolazione dei campioni come indicato sopra. I valori in basso sono indicativi dell'intervallo di riferimento atteso e calcolati come il 97.5 percentile di 256 campioni di eparina plasma da donatori di sangue. Intervallo di riferimento livello di eparina-plasma della cromogranina A: 108 ng/mL (o 3.0 nmol/L o 35 U/L).

XV. LIMITAZIONI

Il livello di cromogranina A individuale del paziente non può essere usato da solo come misura della gravità della malattia. Il test non deve essere considerato come unica base per le decisioni prese per la terapia clinica, ma deve essere usato in combinazione con i sintomi clinici e i risultati di altri test disponibili.

XVI. PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

Per uso diagnostico in vitro.

I reagenti del test non contengono componenti di siero umano, ma i plasma dei pazienti devono essere manipolati come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.

I centri di controllo e prevenzione delle malattie e gli istituti sanitari nazionali raccomandano la manipolazione di agenti infetti con livello di biosicurezza 2.

La maggior parte delle soluzioni del kit contengono ProClin 300 come conservante. Non pipettare mai con la bocca, evitare che i reagenti o campioni del paziente entrino in contatto con la pelle. I reagenti contenenti ProClin 300 possono essere irritanti. Evitare il contatto con pelle e occhi. In caso di contatto, sciacquare con abbondante acqua.

La soluzione stop contiene 0.5 M di acido solforico. Non consentire al reagente di entrare in contatto con la pelle.

La concentrazione di cromogranina A in un dato campione determinato con test di diversi fabbricanti può variare per via delle differenze nel metodo di analisi e della specificità dei reagenti.

Tutti i rifiuti vanno trattati come rifiuti pericolosi.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Ramage J et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoids) tumours (NETs) (Gut 2012; 61:6-32)
2. Pape U-F et al. ENETS Consensus Guidelines, Neuroendocrinology 2012;95:135-15
3. Vinik et al. NANETS Guidelines, Pancreas 2010; 39(6): 713-734
4. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. New England Journal of Medicine 1986, 314:1145-1151.
5. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K. Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments. Journal of Endocrinology 1993, 139:329-337.
6. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. Journal of Endocrinology 1995, 144:49-59.
7. Stridsberg, M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods. Advanced Experimental and Medical Biology 2000, 482:319-327.
8. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R. The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives. Neuroscience 1992, 49:497-528.

XVII. RIASSUNTO DEL PROTOCOLLO

	CALIBRATORI (µl)	CAMPIONE/I CONTROLLI (µl)
Calibratori (1-6) Campioni, controlli	100 -	- 100
Incubare per 60 min a temperatura ambiente. Aspirare i contenuti di ciascun pozzetto. Lavare 3 volte con 300 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Coniugare	100	100
Incubare per 30 min a temperatura ambiente. Aspirare i contenuti di ciascun pozzetto. Lavare 3 volte con 300 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione cromogenica	100	100
Incubare per 15 min a temperatura ambiente.		
Soluzione Stop	100	100
Leggere su una piastra per microtitolazione e registrare l'assorbanza di ciascun pozzetto a 450 nm (vs. 630 o 650 nm)		

Altre traduzioni delle presenti istruzioni sono scaricabili dal nostro sito web: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lea todo el protocolo antes de usar.

CHROMOGRANIN A – ELISA

I. INDICACIONES

El kit de ensayo CHROMOGRANIN A - ELISA es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección y cuantificación de cromogranina A en plasma o suero humanos. Los resultados del ensayo pueden utilizarse como ayuda para el diagnóstico de tumores neuroendocrinos (TNE) que segregan cromogranina, como feocromocitomas y carcinoides. El ensayo está indicado para utilizarse en pacientes con signos y síntomas que concuerdan con los TNE. No está indicado para la detección en población sana.

El análisis debe ser realizado por profesionales de laboratorio con experiencia.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre comercial:** DIAsource CHROMOGRANIN A - ELISA
- B. Número de catálogo:** CGA: 96 pruebas
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

1. Actividades biológicas

Las cromograninas y secretograninas constituyen una familia de proteínas ácidas únicas que, junto con neurotransmisores y hormonas peptídicas, se almacenan en el cerebro y en el sistema neuroendocrino difuso (Winkler, H. y Fischer-Colbrie, R. 1992). Estructuralmente, estas proteínas son productos de diferentes genes, pero comparten algunas propiedades generales, como la abundancia de residuos de aminoácidos ácidos y varios pares de aminoácidos básicos como posibles posiciones de la escisión postraduccional. Las cromograninas se almacenan y liberan junto con neuropéptidos y hormonas en las células neuroendocrinas de todo el cuerpo. Se ha sugerido que las cromograninas tienen algún papel en la producción de gránulos hormonales y paquetes de hormonas. Además, las cromograninas pueden dividirse en fragmentos más pequeños, que pueden mostrar actividades biológicas como la inhibición de la liberación hormonal, la vasodilatación y efectos antimicrobiológicos (Stridsberg M, 2000).

Los tumores de origen neuroendocrino suelen presentarse con un aumento de los niveles de cromogranina A en suero o plasma (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). Los tumores neuroendocrinos derivan de las células neuroendocrinas, y los tumores más típicos son tumores carcinoides, feocromocitomas, neuroblastomas, cánceres pulmonares de células pequeñas, adenomas hiperparatiroideos, tumores pituitarios y tumores de islotes pancreáticos, incluidos los síndromes MEN1 y MEN2.

2. Aplicación clínica


La utilidad clínica de la cromogranina A se ha investigado en una gran cantidad de ensayos clínicos, y se ha definido en varias directrices internacionales (Pape U-F y cols., 2012, Vinik y cols., 2010 y Ramage, J. y cols. 2012). En ellas se describe el papel de la cromogranina A en las diferentes fases de la gestión del paciente y se afirma que la cromogranina A es un biomarcador útil durante todo el curso de la enfermedad del paciente:

- Para ayudar en el diagnóstico inicial y las pruebas iniciales
- Para monitorizar el progreso de la enfermedad

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

En una placa de dilución separada, las muestras de pacientes, los calibradores y los controles se diluyen 5 veces en Diluyente que contiene anticuerpos contra cromogranina A marcados con biotina. El material diluido se transfiere a los pocillos de microtitulación recubiertos con estreptavidina y se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos. Durante esta primera incubación, un anticuerpo monoclonal captura la cromogranina A en la superficie del pocillo. Después del lavado para eliminar el material no unido, se añade un segundo anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para detectar la unión de la cromogranina A al pocillo. Tras una incubación de 30 minutos, los pocillos se vuelven a lavar, se añade un sustrato de color y se incuba. La aparición del color se detiene 15 minutos después y el color se mide en un espectrofotómetro. El color es directamente proporcional a la cantidad de cromogranina A unida al pocillo. La cantidad de cromogranina se determina comparándola con el color de las muestras del calibrador. El calibrador del kit es un péptido sintético que corresponde a la cromogranina A. El calibrador péptido está configurado para dar una respuesta igual a la de un fragmento de cromogranina A nativo purificado. (Stridsberg, M y cols. 1993, Stridsberg y cols. 1995).

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Reconstitución			
 Placa de microvaloración de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina	96 pocillos	Listo para usar			
<table border="1" data-bbox="71 840 327 884"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugado que contiene anticuerpos marcados por HRP contra cromogranina A. Concentrado 100 x	Ab	HRP	CONC	1 vial 150 µl	Diluir 100 x con tampón del conjugado
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="71 974 247 1019"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampón del conjugado + 0.01% de gentamicina	CONJ	BUF	1 vial 15 ml	Listo para usar	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="71 1075 247 1120"> <tr> <td>DIL</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Diluyente que contiene anticuerpos marcados con biotina contra cromogranina A	DIL	BUF	1 vial 36 ml	Listo para usar	
DIL	BUF				
<table border="1" data-bbox="71 1198 247 1243"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibradores 1 a 6 que contienen cromogranina A humana en diluyente. CAL 1 = 0 ng/ml (diluyente), CAL 2 = 36 ng/ml, CAL 3 = 180 ng/ml, CAL 4 = 540 ng/ml, CAL 5 = 1080 ng/ml, CAL 6 = 1800 ng/ml.	CAL	N	6 viales liofilizados	Añadir 0,6 ml de agua destilada	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="71 1467 327 1512"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solución de lavado concentrada 20 x.	WASH	SOLN	CONC	1 vial 70 ml	Diluir 20 x con agua destilada
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="71 1579 247 1624"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controles - N = 1 o 2	CONTROL	N	2 viales liofilizados	Añadir 0,6 ml de agua destilada	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="71 1668 247 1713"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Solución de TMB cromogénica (tetrametilbencidina)	CHROM	TMB	1 vial 15 ml	Listo para usar	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="71 1758 247 1803"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Solución de parada: 0,5M H ₂ SO ₄	STOP	SOLN	1 vial 15 ml	Listo para usar	
STOP	SOLN				

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

- El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:
- Lector de placa de microvaloración con filtro de 450. La longitud de onda de referencia es 620 nm.
 - Placa de dilución con 300 µl/pocillo para la dilución del calibrador, las muestras del paciente y los controles.
 - Pipetas de precisión con puntas desechables.
 - Lavador automático de placas de microvaloración, papel absorbente, tubos y cronómetro.

Antes de usar

- Los calibradores y controles liofilizados deben disolverse con cuidado en 600 µl de agua destilada. Después del uso, los calibradores y controles reconstituidos deben conservarse a una temperatura de -20 °C o inferior. Los calibradores y controles pueden pasar por tres ciclos de congelación y descongelación sin deteriorarse.
- Los demás reactivos del kit deben conservarse a 2-8 °C.
- Los calibradores y controles reconstituidos deben diluirse 5 x en diluyente en cada ensayo.
- La cantidad de conjugado requerido para cada análisis debe diluirse 100 x antes de usarse (10 µl de conjugado+ 990 µl de tampón del conjugado por tira). El conjugado diluido restante debe desecharse.
- La solución de lavado debe diluirse 20 x antes de su uso. Diluir 10 ml de la solución de lavado concentrada 20 x en 190 ml de agua destilada. Cuando se conserva a 2-8 °C, la solución de lavado diluida se mantiene estable hasta la fecha de caducidad del kit.
- El resto de reactivos del kit están listos para usarse.
- Retire solo la cantidad de pocillos necesarios para el ensayo y selle de nuevo el envase de aluminio con cuidado.

VIII. RECOGIDA DE MUESTRAS

El ensayo CHROMOGRANIN A - ELISA está recomendado para muestras de suero y plasma de heparina.

Manipular como posible transmisor de agentes infecciosos.

Las muestras se separan por centrifugación y se pueden conservar a 2-8 °C hasta 7 días. Si las muestras se van a guardar durante más tiempo, conservarlas a una temperatura de -20 °C o inferior. Las muestras pueden pasar por tres ciclos de congelación y descongelación sin deteriorarse.

No utilizar un congelador «No Frost» ya que puede que las muestras pasen por ciclos de congelación y descongelación y los anticuerpos se degraden. Las muestras que se conservan de forma inadecuada o sujetas a múltiples ciclos de congelación y descongelación pueden arrojar resultados falsos.

IX. PROCEDIMIENTO

A. Notas sobre la manipulación

Todas las soluciones deben utilizarse a temperatura ambiente. Incube todos los pasos a temperatura ambiente (20-30 °C).

B. Procedimiento

Dilución de la muestra e incubación

Diluya todas las muestras 5 x en una placa de dilución separada antes de transferirlas a la placa de ensayo. Los calibradores, el control inferior, el control superior y el plasma del paciente deben diluirse en 50 µl plasma + 200 µl diluyente.

Mezclar completamente pipeteando arriba y abajo antes de transferir 100 µl por duplicado a la placa de ensayo, de acuerdo con el diagrama siguiente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL5	P1									
B	CAL1	CAL5	P1									
C	CAL2	CAL6	P2									
D	CAL2	CAL6	P2									
E	CAL3	H	etc.									
F	CAL3	H										
G	CAL4	L										
H	CAL4	L										

Incube durante 60 minutos.

Después de la incubación de la muestra

Aspirar y lavar tres (3) veces con 300 µl de solución de lavado/pocillo, llenando y vaciando los pocillos cada vez. Tras el último lavado, vaciar los pocillos dándole golpecitos a la placa de microvaloración sobre un papel absorbente.

Añadir el conjugado

Añada 100 µl de conjugado a cada pocillo. Incube durante 30 minutos.

Después de la incubación del conjugado

Lavar como se ha indicado antes.

Añadir la solución de sustrato

Añadir 100 µl de sustrato TMB a cada pocillo, incubar en la oscuridad durante 15 minutos.

El tiempo de incubación puede reducirse hasta 10 minutos si la densidad óptica (DO) máxima excede 3,0 a altas temperaturas o si se aplica un método automático.

Añadir solución de parada

Añada 100 µl de solución de parada a cada pocillo.
Lea la absorbancia a 450 nm antes de transcurridas 2 horas en un lector de microplacas. Lea a 620 nm como longitud de onda de referencia.

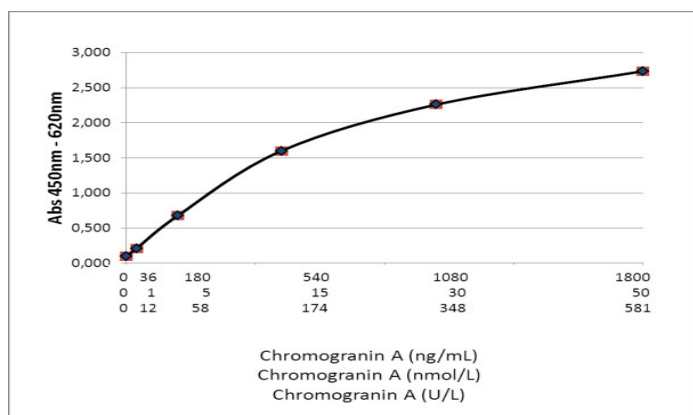
XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Genere una curva de calibración trazando la DO frente a los valores ng/ml de los seis calibradores. Los seis calibradores suministrados tienen valores de 0 ng/ml para el calibrador 1, 36 ng/ml para el calibrador 2, 180 ng/ml para el calibrador 3, 540 ng/ml para el calibrador 4, 1080 ng/ml para el calibrador 5 y 1800 ng/ml para el calibrador 6, respectivamente. Lea los valores de los controles inferior y superior y las muestras del paciente de la curva.

Los valores mayores que el valor más alto del calibrador deben notificarse como >1800 ng/ml, o diluirse más con el diluyente del ensayo y volver a analizarse. En ese caso la compensación de la dilución debe hacerse en el cálculo de la concentración de cromogranina A. Tenga en cuenta que en el caso de que los valores del calibrador 1 o del calibrador 6 estén fuera del intervalo, el ensayo debe considerarse no válido y repetirse.

Por comodidad las concentraciones se pueden calcular en ng/ml, nmol/l o U/l. Todas las unidades se muestran en la tabla siguiente. El peso molecular del fragmento nativo de cromogranina A (36kDa) se utilizó para la conversión (Stridsberg, M y cols. 1993, Stridsberg y cols. 1995).

Calibrador	Concentración			Absorbancia
	ng/ml	nmol/l	U/l	
1	0	0	0	0,094
2	36	1	12	0,209
3	180	5	58	0,678
4	540	15	174	1,599
5	1080	30	348	2,259
6	1800	50	581	2,735



Una muestra con un valor de absorbancia de 1,272 aparecerá en el eje X con 367 ng/ml (o 10,2 nmol/l o 118 U/l) de cromogranina A. En este ejemplo se ha aplicado un ajuste de curva logística de cuatro parámetros.

Importante: La curva es un ejemplo y no debe utilizarse para la interpretación de una muestra de paciente real.

XII. EFICACIA

A. Sensibilidad

El LoB (límite del blanco) se calculó por medición del blanco veinticuatro veces y se calculó como la media + 3 desviación estándar de la distribución de los valores de la prueba. Se calculó que el LoB era 2,24 ng/ml.

El LoD (límite de detección) de las muestras de suero se calculó como el LoB + 1,65 desviación estándar de una muestra de concentración baja evaluado en 10 análisis diferentes.

Se calculó que el LoD era 5,34 ng/ml para muestras de suero.

Se calculó que el LoD era 4,42 ng/ml para plasma de heparina.

El LoQ (límite de cuantificación) de las muestras de suero se calculó analizando 5 muestras de valores bajos 10 veces. Se calculó que el LoQ era 53,26 ng/ml.

Se puede observar un aumento de los niveles de cromogranina A en pacientes con función renal reducida, pacientes con gastritis atrófica y pacientes con tratamientos en curso con fármacos inhibidores de la bomba de protones.

B. Precisión

INTRAENSAYO				INTERENSAYO			
Muestra	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Muestra	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
1	24	90.3 ± 6.6	7.3	1	10	130.84 ± 9.87	7.5
2	24	333.8 ± 13.9	4.2	2	10	318.14 ± 24.6	7.7
3	24	620 ± 18.8	3	3	10	645.73 ± 42.33	6.6
4	24	906.9 ± 59.9	6.6	4	10	977.7 ± 34.03	3.5
-	-	-	-	5	10	125.81 ± 8.90	7.1
-	-	-	-	6	10	991.67 ± 68.48	6.9

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

C. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

Muestra	Adición de reactivo	Observado (ng/ml)	Esperado (ng/ml)	Recuperación (O/E) (%)
1	-	82.0	-	-
	232.9	317.6	314.9	1.0
	426.3	536.4	508.3	1.1
	536.6	702.9	618.6	1.1
2	-	207.8	-	-
	232.9	447.7	440.7	1.0
	426.3	663.1	634.1	1.0
	536.6	846.6	744.4	1.1
3	-	149.1	-	-
	212.9	370.7	362.0	1.0
	393.2	558.0	542.3	1.0
	570.5	752.1	719.6	1.0
4	-	367.3	-	-
	212.9	613.8	580.2	1.1
	393.2	815.8	760.5	1.1
	570.5	999.2	937.8	1.1

PRUEBA DE DILUCIÓN

PRUEBA DE DILUCIÓN - muestras de suero				
Muestra	Dilución	Observado (ng/ml)	Esperado (ng/ml)	Recuperación (O/E) (%)
1	1/1	1194.6	-	-
	1/2	641.2	597.3	107
	1/4	290.4	298.7	97
	1/8	130.9	149.3	88
2	1/1	967	-	-
	1/2	472.3	483.5	98
	1/4	236.6	241.8	98
	1/8	125.3	120.9	104
3	1/1	1119.9	-	-
	1/2	562.3	560.0	100
	1/4	272.6	280.0	97
	1/8	130.3	140.0	93
4	1/1	993.6	-	-
	1/2	498.5	496.8	100
	1/4	241.1	248.4	97
	1/8	117.7	124.2	

PRUEBA DE DILUCION – muestras de plasma de heparina				
Muestra	Dilución	Observado (ng/ml)	Esperado (ng/ml)	Recuperación (O/E) (%)
1	1/1	699.2	-	-
	1/2	326.3	349.6	93
	1/4	163.7	174.8	94
	1/8	83.8	87.4	96
2	1/1	701.6	-	-
	1/2	328.8	350.8	94
	1/4	154.7	175.4	88
	1/8	72.5	87.7	83
3	1/1	740.8	-	-
	1/2	321.0	370.4	87
	1/4	158.5	185.2	86
	1/8	82.9	92.6	90
4	1/1	676.5	-	-
	1/2	314.3	338.3	93
	1/4	154.6	169.1	91
	1/8	78.0	84.6	92

Las muestras se diluyeron con el calibrador 1.

D. Efecto gancho.

No se observa efecto gancho al analizar concentraciones de cromogranina A de hasta 360 000 ng/ml (o 10 000 nmol/l o 116 000 U/l).

E. Especificidad

No se detectó reactividad cruzada cuando se analizaron siete marcadores de tumores neuroendocrinos, es decir, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), enolasa neuroespecífica, glucagón, gastrina, cromogranina B, polipéptido pancreático y polipéptido intestinal vasoactivo, con el ensayo DIAsource Chromogranin A.

F. Interferencia

INTERFERENCIA				
Muestra	Adición interferente (ng/ml)	Sin interferir (ng/ml)	Proporción (%)	Desviación (%)
Hemoglobina + 4.84 g/l				
1	124.6	136.6	91	9
2	301.4	319.8	94	6
3	527.8	540.1	98	2
4	719.3	768.2	94	6
Bilirrubina no conjugada + 208 mg/l				
1	124.8	136.6	91	9
2	305.8	319.8	96	4
3	497.9	540.1	92	8
4	715.4	768.2	93	7
Triglicéridos + 20 mg/ml				
1	124.2	136.6	91	9
2	307.5	319.8	96	4
3	489.5	540.1	91	9
4	735.1	768.2	96	4
Bilirrubina conjugada + 200 mg/l				
1	124.6	136.6	91	9
2	311	319.8	94	6
3	510.3	540.1	98	2
4	752.4	768.2	94	6
Biotina + 10 ng/ml				
1	127.7	136.6	93	7
2	309.3	319.8	97	3
3	498.4	540.1	92	8
4	726.3	768.2	95	6

No se confirmó ninguna interferencia detectable con hemoglobina (4,84 g/l), bilirrubina no conjugada (208 mg/l), triglicéridos (20 mg/ml), bilirrubina conjugada (200 mg/l) y biotina (10 ng/ml).

Una alta ingesta de biotina (en suplementos o fármacos) puede interferir con el ensayo y producir resultados bajos falsos.

G. Sensibilidad y especificidad clínicas

Sensibilidad

Se analizaron un total de 186 muestras de plasma heparinizado con caracterización clínica. En la siguiente tabla se resumen los resultados

Grupos de enfermedad	Número total	Positivo >3,0 nmol/l	Negativo ≤ 3,0 nmol/l	Sensibilidad %
FGC, MGC	136	98	38	72
EPT	30	19	11	63
LC	9	4	5	44
NE Diff	6	2	4	33
ECL	4	3	1	75
Paraganglioma	1	1	0	100

ECL = Tumores similares a los enterocromafines

EPT = Tumor neuroendocrino pancreático

FGC = Carcinoide del intestino anterior

LC = Carcinoide pulmonar

MGC = Carcinoide del intestino medio

NE Diff = Diferenciación neuroendocrina

Especificidad

Se analizaron 56 muestras de plasma heparinizado de donantes de sangre aparentemente sanos, 55 muestras resultaron negativas:

55/56 = 98,2%

Se analizaron 210 muestras séricas de donantes de sangre aparentemente sanos, 209 muestras resultaron negativas:

209/210 = 99,5%

XIII. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

La DO para el calibrador 1 debe ser < 0,15

La DO para el calibrador 6 debe ser > 1,0

Los valores del control inferior y superior, véase el certificado del lote.

Los controles están indicados para monitorizar el fallo sustancial de reactivos. Si alguno de los valores del control no estuviera dentro de su intervalo respectivo, la prueba debe considerarse no válida y repetirse. Pueden analizarse controles adicionales de acuerdo con las directrices o requisitos de la normativa local, estatal y/o federal o de las organizaciones acreditadas. Consulte NCCLS C24-A para informarse sobre las prácticas de CC adecuadas.

XIV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Se recomienda que cada laboratorio establezca un intervalo de referencia con las muestras utilizadas habitualmente, ya que las variaciones en la manipulación de muestras pueden afectar a los resultados. Debe seguirse una estricta rutina para la manipulación de muestras, tal como se ha recomendado anteriormente. Los valores mostrados abajo indican el intervalo de referencia esperado y calculado como el percentil 97,5 de 256 muestras de plasma heparinizado de donantes de sangre.

Intervalo de referencia del nivel en plasma heparinizado de cromogranina A: 108 ng/ml (o 3,0 nmol/l o 35 U/l).

XV. LIMITACIONES

El nivel de cromogranina A de cada paciente no puede utilizarse por sí solo como medida de la gravedad de la enfermedad. La prueba no debe ser la única base para las decisiones sobre el tratamiento clínico, sino que debe tenerse en cuenta junto con los síntomas clínicos y los resultados de otras pruebas disponibles.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Para uso diagnóstico in vitro.

Los reactivos del ensayo no contienen componentes de suero humano, pero el plasma de los pacientes analizados debe manipularse como posible transmisor de agentes infecciosos.

Los centros de control y prevención de enfermedades y los institutos nacionales de salud recomiendan que los posibles agentes infecciosos se manipulen en el nivel de bioseguridad 2.

La mayoría de las soluciones del kit contienen ProClin 300 como conservante. No pipetee nunca con la boca y evite que los reactivos o la muestra del paciente entren en contacto con la piel. Los reactivos que

contienen ProClin 300 pueden provocar irritación. Evitar el contacto con la piel y los ojos. En caso de contacto, lavar con abundante agua.

La solución de parada contiene ácido sulfúrico 0,5 M. Evite que el reactivo entre en contacto con la piel.

Las concentraciones de cromogranina A de una muestra concreta determinadas a través de los ensayos de los distintos fabricantes pueden variar debido a las diferencias entre los métodos de ensayo y la especificidad de los reactivos.

Todos los residuos deben manipularse como residuos peligrosos.

XVII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ramage J et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoids) tumours (NETs) (Gut 2012; 61:6-32
2. Pape U-F et al. ENETS Consensus Guidelines, Neuroendocrinology 2012;95:135-15
3. Vinik et al. NANETS Guidelines, Pancreas 2010; 39(6): 713-734
4. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. New England Journal of Medicine 1986, 314:1145-1151.
5. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Helsing, K. and Öberg, K. Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments. Journal of Endocrinology 1993, 139:329-337.
6. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. Journal of Endocrinology 1995, 144:49-59.
7. Stridsberg, M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods. Advanced Experimental and Medical Biology 2000, 482:319-327.
8. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R. The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives. Neuroscience 1992, 49:497-528.

XVII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µl)	MUESTRA(S) CONTROLES (µl)
Calibradores (1-6) Muestras, controles	100 -	- 100
Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 300 µl de solución de lavado y aspire.		
Conjugado	100	100
Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 300 µl de solución de lavado y aspire.		
Solución cromogénica	100	100
Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente.		
Solución de parada	100	100
Lea en un lector de placas de microvaloración y registre la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (frente a 630 o 650 nm).		

Otras traducciones de estas instrucciones de uso disponibles para su descarga en nuestra página web:

<https://www.diasource-diagnostics.com/>