



IMMUNOASSAYS AND SERVICES

BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Instructions for use
Chromogranin A ELISA

REF

TM E-9000



IVD



1. Introduction

1.1 Intended use and principle of the test

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

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

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

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

1.2 Clinical application

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

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

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

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

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as under point "Procedural cautions, guidelines and warnings". Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of the patient.

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

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

2. Procedural Cautions, Guidelines, Warnings and Limitations

2.1 Procedural Cautions, Guidelines and Warnings

- (1) This kit is intended for professional use only. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Only the test instruction provided with the kit is valid and has to be used to run the assay. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- (2) This assay was validated for a certain type of sample as indicated in *Intended Use* (please refer to Chapter 1). Any off-label use of this kit is in the responsibility of the user and the manufacturer cannot be held liable.
- (3) Reagents of this kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- (4) The principles of Good Laboratory Practice (GLP) have to be followed.
- (5) In order to reduce exposure to potentially harmful substances, wear lab coats, disposable protective gloves and protective glasses where necessary.
- (6) All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- (7) For dilution or reconstitution purposes, use deionized, distilled, or ultra-pure water.
- (8) The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch with desiccant and used in the frame provided.
- (9) Duplicate determination of sample is highly recommended to be able to identify potential pipetting errors.
- (10) Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that the required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time.
- (11) Incubation times do influence the results. All wells should be handled in the same order and time intervals.
- (12) To avoid cross-contamination of reagents, use new disposable pipette tips for dispensing each reagent, sample, standard and control.

- (13) A standard curve must be established for each run.
- (14) The controls should be included in each run and fall within established confidence limits. The confidence limits are listed in the QC-Report.
- (15) Do not mix kit components with different lot numbers within a test and do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- (16) Avoid contact with Stop Solution containing 0.25 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns. In case of contact with eyes or skin, rinse off immediately with water.
- (17) TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them.
- (18) For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets (MSDS). The Material Safety Data Sheet for this product is made available directly on the website of the manufacturer or upon request.
- (19) The expected reference values reported in this test instruction are only indicative. It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.
- (20) The results obtained with this test kit should not be taken as the sole reason for any therapeutic consequence but have to be correlated to other diagnostic tests and clinical observations.
- (21) Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

2.2 Limitations

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

2.2.1 Interfering substances

Serum/Plasma

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

2.2.2 Drug interferences

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

2.2.3 Measuring range

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

2.2.4 High-Dose-Hook effect

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

3. Storage and stability

Store the unopened reagents at 2 - 8 °C until expiration date. Do not use components beyond the expiry date indicated on the kit labels. Once opened the reagents are stable for 1 month when stored at 2 - 8 °C. Once the resealable pouch has been opened, care should be taken to close it tightly with desiccant again.

4. Materials

4.1 Content of the kit

BA E-0030 WASH-CONC 50x **Wash Buffer Concentrate** - Concentrated 50x

Content: Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH

Volume: 1 x 20 ml/vial, light purple cap

TM E-9010 CONJUGATE **Antibody Conjugate** - Ready to use

Content: Rabbit anti-chromogranin A antibody, conjugated with peroxidase

Volume: 1 x 6 ml/vial, red cap

TM E-9055 SUBSTRATE **Substrate** - Ready to use

Content: Chromogenic substrate containing tetramethylbenzidine, substrate buffer and hydrogen peroxide

Volume: 1 x 12 ml/vial, black cap

BA E-0080 STOP-SOLN **Stop Solution** - Ready to use

Content: 0.25 M sulfuric acid

Volume: 1 x 12 ml/vial, light grey cap

TM E-9031  **Chromogranin A Microtiter Strips** - Ready to use
 Content: 1 x 96 well (12x8) antibody precoated microwell plate in a resealable pouch with desiccant

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Colour/Cap	Concentration µg/l	Volume/Vial
TM E-9001	STANDARD A	white	0	1 ml
TM E-9002	STANDARD B	light yellow	30	1 ml
TM E-9003	STANDARD C	orange	100	1 ml
TM E-9004	STANDARD D	dark blue	350	1 ml
TM E-9005	STANDARD E	light grey	700	1 ml
TM E-9051	CONTROL 1	light green	Refer to QC-Report for expected value and acceptable range!	1 ml
TM E-9052	CONTROL 2	dark red		1 ml

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

TM E-9013 **Assay Buffer** - Ready to use

Content: Buffer with proteins and non-mercury preservatives

Volume: 1 x 50 ml/vial, blue cap

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

- Calibrated precision pipettes to dispense volumes of 25, 50, 100, and 200 µl
- Microtiter plate washing device (manual, semi-automated or automated)
- ELISA reader capable of reading absorbance at 450 nm and if possible 620 - 650 nm
- microtiter plate shaker (shaking amplitude 3 mm; approx. 600 rpm)
- Absorbent material (paper towel)
- Water (deionized, distilled, or ultra-pure)
- Vortex mixer

5. Sample collection and storage

Serum

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

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

Storage: for longer period (up to 6 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

Plasma

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

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

Storage: for longer period (up to 6 month) at -20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided.

6. Test procedure

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

The binding of the antisera and the enzyme conjugates and the activity of the enzyme used are temperature dependent, and the absorption values may vary if a thermostat is not used. The higher the temperature, the higher the absorption values will be. The extinction values also depend on the incubation times. The optimal temperature during the Enzyme Immunoassay is between 20 – 25 °C.



In case of overflow, read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to 405 nm

6.1 Preparation of reagents and samples

Wash Buffer

Dilute the 20 ml Wash Buffer Concentrate with water (deionized, distilled, or ultra-pure) to a final volume of 1000 ml.

Storage: 1 month at 2 – 8 °C

Predilution of samples

Prior to use, the samples have to be diluted **1+8** with **Assay Buffer** (TM E-9013), e.g. 25 µl of sample + 200 µl of Assay Buffer.

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

6.2 Chromogranin A ELISA

1.	Pipette 50 µl of the standards, controls and diluted samples into the wells of the Chromogranin A Microtiter Strips and incubate 1 h at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
2.	Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate 4 x by adding 300 µl of Wash Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
3.	Pipette 50 µl of the Antibody-Conjugate into all wells and incubate 1 h at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).
4.	Discard or aspirate the content of the wells. Wash the plate 4 x by adding 300 µl of Wash Buffer , discarding the content and blotting dry each time by tapping the inverted plate on absorbent material.
5.	Pipette 100 µl of the Substrate into all wells.
6.	Incubate for 25 ± 5 min at RT (20 – 25 °C) on a shaker (approx. 600 rpm).  Avoid exposure to direct sunlight!
7.	Add 100 µl of the Stop Solution to each well and shake the microtiter plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.
8.	Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microtiter plate reader set to 450 nm (if available a reference wavelength between 620 nm and 650 nm is recommended).

7. Calculation of results

Measuring range	Serum	12.5 – 700 µg/l
	EDTA-Plasma	8 – 700 µg/l

The standard curve is obtained by plotting the absorbance readings (calculate the mean absorbance) of the standards (linear, y-axis) against the corresponding standard concentrations (logarithmic, x-axis). Use a non-linear regression for curve fitting (e.g. spline, 4- parameter, akima).

Samples and controls

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

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

Expected reference values

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

Expected reference value	Serum/EDTA-Plasma	< 100 µg/l
---------------------------------	-------------------	------------

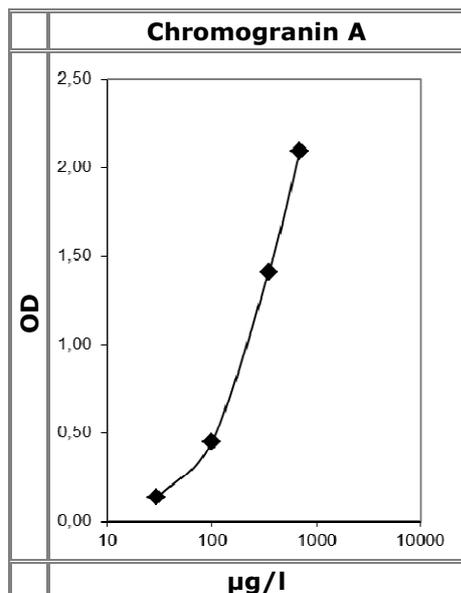
7.1 Quality control

It is recommended to use control samples according to national regulations. Use controls at both normal and pathological levels. The kit, or other commercially available controls should fall within established confidence limits. The confidence limits of the kit controls are listed in the QC-Report.

7.2 Typical standard curve



Example, do not use for calculation!



8. Assay characteristics

Analytical Sensitivity	Serum	EDTA-Plasma
Limit of Detection (LOD)	5 µg/l	5 µg/l
Limit of Quantification (LOQ)	12.5 µg/l	8 µg/l

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

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

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

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

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

9. References/Literature

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

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

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	LOT	Batch code	IVD	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE labelled
	Caution	REF	Catalogue number	RUO	For research use only!

1. Einleitung

1.1 **Verwendungszweck und Testprinzip**

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

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

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

1.2 **Klinische Anwendung**

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

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

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

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

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

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

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

Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein.

2. Verfahrenshinweise, Richtlinien, Warnungen und Anwendungsgrenzen

2.1 **Verfahrenshinweise, Richtlinien und Warnungen**

- (1) Dieses Kit ist nur für den gewerblichen Gebrauch. Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Kits benötigen die Anwender ein umfassendes Verständnis dieses Protokolls. Einzig die im Kit enthaltene Testanleitung ist gültig und bei der Durchführung des Assays zu verwenden. Für eine zuverlässige Leistung müssen die mitgelieferten Anweisungen genau und sorgfältig befolgt werden.
- (2) Dieser Assay wurde für die unter *Verwendungszweck* (siehe Kapitel 1) angegebene Probenart validiert. Jede nicht zugelassene Anwendung dieses Kits obliegt der Verantwortung des Anwenders und entbindet den Hersteller von jeglicher Haftung.
- (3) Die humanes Serum oder Plasma enthaltenden Reagenzien des Kits wurden mit geprüften Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Dennoch sollten sämtliche Reagenzien bei der Handhabung und Entsorgung als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandelt werden.
- (4) Die Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu befolgen.
- (5) Bei Bedarf Laborkittel, geeignete Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen, um die Exposition gegenüber potenziell gesundheitsgefährdenden Stoffen zu reduzieren.
- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Wenn die Verdünnung oder Rekonstitution mit Wasser erfolgen soll, hierfür deionisiertes, destilliertes oder ultra-pures Wasser verwenden.
- (8) Die Mikrotiterplatte verfügt über abbrechbare Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.

- (9) Es ist sehr empfehlenswert, eine Doppelbestimmung der Proben durchzuführen, um mögliche Pipettierfehler erkennen zu können.
- (10) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (11) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Vertiefungen sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (12) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (13) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (14) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen können dem QC-Bericht entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (15) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (16) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H₂SO₄ enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (17) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (18) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe die Sicherheitsdatenblätter (MSDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (19) Die in dieser Testanleitung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (20) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.
- (21) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

2.2 Grenzen des Tests

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

2.2.1 Interferenzen

Serum/Plasma

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

2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

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

2.2.3 Messbereich

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

2.2.4 High-Dose-Hook Effekt

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

3. Lagerung und Haltbarkeit

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufzubewahren. Die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 1 Monat stabil, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets mit Trockenmittelbeutel sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4. Materialien

4.1 Reagenzien im Kit

BA E-0030 **WASH-CONC 50x** **Wash Buffer Concentrate - 50x** konzentriert

Inhalt: Buffer with a non-ionic detergent and physiological pH

Volumen: 1 x 20 ml/Fläschchen, Deckel helllila

- TM E-9010** **CONJUGATE** **Antibody Conjugate** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Kaninchen Anti-Chromogranin A Antikörper, konjugiert mit Peroxidase
 Volumen: 1 x 6 ml/ Fläschchen, Deckel rot
- TM E-9055** **SUBSTRATE** **Substrate** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Chromogenes Substrat mit Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid
 Volumen: 1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel schwarz
- BA E-0080** **STOP-SOLN** **Stop Solution** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 0,25 M Schwefelsäure
 Volumen: 1 x 12 ml/ Fläschchen, Deckel hellgrau
- TM E-9031** **96** **Chromogranin A Microtiter Strips** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antikörper beschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem widerverschließbaren Beutel

Standards und Controls - Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration µg/l	Volumen/Fläschchen
TM E-9001	STANDARD A	weiß	0	1 ml
TM E-9002	STANDARD B	hellgelb	30	1 ml
TM E-9003	STANDARD C	orange	100	1 ml
TM E-9004	STANDARD D	dunkelblau	350	1 ml
TM E-9005	STANDARD E	hellgrau	700	1 ml
TM E-9051	CONTROL 1	hellgrün	Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben	1 ml
TM E-9052	CONTROL 2	dunkelrot		1 ml

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

- TM E-9013** **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Puffer mit Proteinen und quecksilberfreien Konservierungsmitteln
 Volumen: 1 x 50 ml/ Fläschchen, Deckel blau

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

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 25, 50, 100 und 200 µl
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620 - 650 nm-Filter
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Vortex-Mischer
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)
- saugfähige Unterlage

5. Probenmaterial und Lagerung

Serum

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

Hämolytische und lipämische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Lagerung: für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Plasma

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

Hämolytische und lipämische Proben sollten nicht zur Analytik verwendet werden.

Lagerung: für längere Zeit (bis zu 6 Monate) bei -20 °C

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

6. Testdurchführung

Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen.

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

 *Liegt die gemessene Absorption außerhalb des Messbereichs, so muss innerhalb von 10 Minuten die Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei 405 nm gemessen werden.*

6.1 Vorbereitung der Reagenzien und Proben

Waschpuffer

20 ml **WASH-CONC 50X** mit Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur) auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 1 Monat bei 2 – 8 °C

Probenvorverdünnung

Die Proben werden vor ihrer Verwendung im ELISA mit **ASSAY-BUFF** (TM E-9013) **1+8** verdünnt (z.B. 25 µl Probe + 200 µl **ASSAY-BUFF**).

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

6.2 Chromogranin A ELISA

1.	Jeweils 50 µl Standards, Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Kavitäten der  pipettieren und 1 Stunde bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
2.	Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 4 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
3.	Jeweils 50 µl CONJUGATE in alle Kavitäten pipettieren und 1 Stunde bei RT (20 – 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
4.	Den Inhalt der Kavitäten ausleeren oder absaugen. Die Kavitäten 4 mal gründlich mit 300 µl Waschpuffer waschen, ausleeren und die Restflüssigkeit jedes Mal durch Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5.	Jeweils 100 µl SUBSTRATE in alle Kavitäten pipettieren.
6.	Für 25 ± 5 Min bei RT (20 - 25 °C) auf einem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubieren.
	Direktes Sonnenlicht vermeiden!
7.	100 µl STOP-SOLN in alle Kavitäten pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
8.	Absorption mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620-650 nm) innerhalb von 10 Minuten messen .

7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Serum	12,5 – 700 µg/l
	EDTA-Plasma	8 – 700 µg/l

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

Proben und Kontrollen

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

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

Erwartete Referenzwerte

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

Erwarteter Referenzbereich	Serum/EDTA-Plasma	< 100 µg/l
-----------------------------------	-------------------	------------

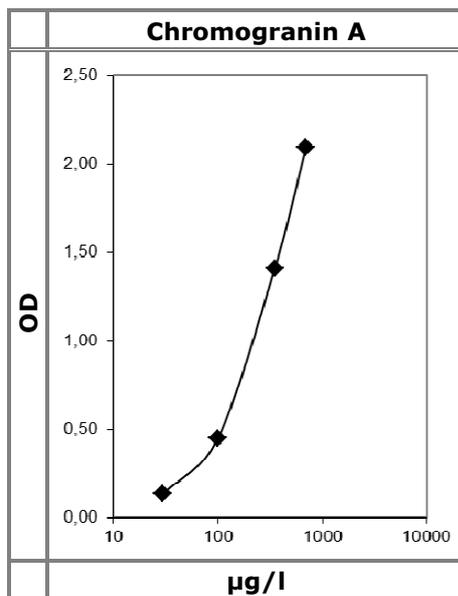
7.1 Qualitätskontrolle

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

7.2 Typische Standardkurve



Beispiel: bitte nicht für die Auswertung verwenden!



8. Testcharakteristika

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

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

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

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

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

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

Methodenvergleich versus Kryptor CgA II	Kryptor = 1,14xLDN + 3,13; r ² = 0,94; n = 82
--	--

9. Referenzen/Literatur

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

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

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen		Inhalt		CE gekennzeichnet
	Achtung		Katalog-Nummer		Nur für Forschungszwecke