



Hu Chromogranin A ELISA

KAPEPKT812



Human Chromogranin A ELISA Kit

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

KAPEPKT812

IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

INTENDED USE

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

SUMMARY OF PHYSIOLOGY

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

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

ASSAY PRINCIPLE

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

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

REAGENTS: Preparation and Storage

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

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

1. Anti-CgA Antibody Coated Microplate

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

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

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

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

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

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

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

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

One bottle containing 20 mL of a 30 fold concentrate. Before use the contents must be diluted with 580 mL of distilled water and mixed well. Upon dilution this yields a working wash solution containing a surfactant in phosphate buffered saline with a non-azide preservative. The diluted solution should be stored at room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.

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

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

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

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

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

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

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

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

SAFETY PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use.

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

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

SPECIMEN COLLECTION

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

ASSAY PROCEDURE

1. Reagent Preparation

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

3. Assay Procedure

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

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

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

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

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

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

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

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

PROCEDURAL NOTES

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

INTERPRETATION OF RESULTS

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

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

REPORTING TEST RESULTS

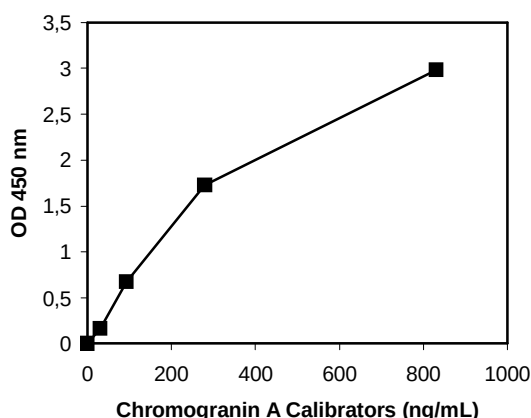
Laboratory should report test results directly derived from the assay. For samples showing high values, it is strongly recommended to dilute the patient sample 1:100 with assay buffer and re-assay the diluted sample for a more accurate test result. If the 1:100 diluted sample still shows a higher value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

EXAMPLE DATA AND CALIBRATION CURVE

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

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

Human Chromogranin A ELISA



EXPECTED VALUES

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

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

LIMITATION OF THE PROCEDURE

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

QUALITY CONTROL

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

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

High Dose "hook" effect

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

Precision

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

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

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

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

Linearity

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

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

Recovery

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

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

REFERENCES

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

Short Assay Procedure:

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

Revision date : 2009-06-03



Human Chromogranin A ELISA Kit

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

KAPEPKT812

IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

VORGESEHENER GEBRAUCH

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

ZUSAMMENFASSUNG DER PHYSIOLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN

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

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

TESTPRINZIP

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

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

REAGENZIEN: Herstellung und Lagerung

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

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

1. Anti-CgA Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte

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

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

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

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

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

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

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

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

Eine Flasche mit 20 ml eines 30-fach Konzentrats. Vor Gebrauch muß der Inhalt mit 580 ml aqua dest. verdünnt und gut gemischt werden. Durch die Verdünnung wird eine gebrauchsfertige Waschlösung mit Tensiden in phosphatgepufferten Salzlösung und einem Non-Azid Konservierungsmittel hergestellt. Die verdünnte Lösung sollte bei Raumtemperatur gelagert werden und ist bis zum Verfallsdatum des Kits auf dem Verpackungsetikett stabil.

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

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

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

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

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

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

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

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

SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

Zum in vitro Gebrauch

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

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

ERFORDERLICHE NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

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

PROBENNAHME

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

TESTDURCHFÜHRUNG

1.Reagenzien Vorbereitung

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

2. Testprozedur

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

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

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

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

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

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

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

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

ANMERKUNGEN ZUR DURCHFÜHRUNG

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

ERGEBNISINTERPRETATION

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

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

MELDUNG DER TESTERGEBNISSE

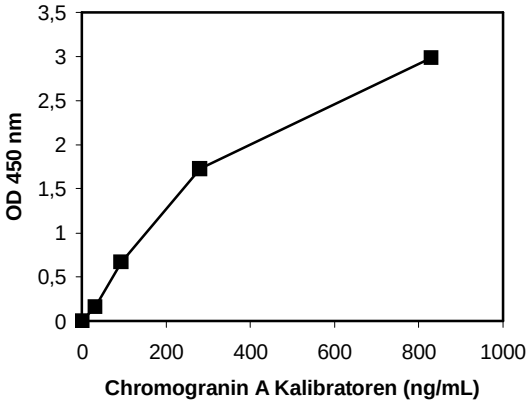
Das Labor sollte nur Testresultate, die direkt vom Test stammen, berichten. Für Proben, die höhere Werte als den 90% -Wert des höchsten Teststandards aufweisen, wird eine 1:100 Verdünnung der Patientenprobe mit Testpuffer gefordert, ebenso ein erneuter Test mit der verdünnten Probe, um exaktere Ergebnisse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

BEISPIELDATEN UND KALIBRATIONSKURVE

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

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

Human Chromogranin A ELISA



ERWARTETE WERTE

Zweiundsiebzig normale Erwachsenenenserren wurden mit diesem humanChromogranin A ELISA gemessen. Die Normalwerte waren unter 100 ng/ml. Fünf Patienten mit Phäochromocytom zeigten einen Chromogranin A Spiegel über 100 ng/ml, einer erreichte 330.000 ng/ml. Es wird gefordert, dass jedes Labor seinen eigenen Normalwert erstellt. Obwohl ein Plasmawert des Chromogranin A,der größer als100 ng/ml ist eine Hilfe bei der klinischen Diagnose darstellt, wird gefordert,dass ein Chromogranin A Basiswert für jeden Patienten zum Monitoring der Krebspatienten nach Operation etabliert wird. Ein klarer Anstieg des Chromogranin A Spiegels würde auf eine angestiegene Krebszellaktivität hindeuten.

GRENZEN DER TESTPROZEDUR

- 1. Weil keine Gold Standard Konzentration für Chromogranin A Messungen verfügbar ist, werden die Werte der Testkalibratoren

- durch Korrelation gegen einen hochgereinigten Chromogranin A Kalibrator ermittelt.
- 2. Wenn das Ergebnis der Probe höher als das des höchsten Kalibrators ist, muß eine stärker verdünnte Probe gemessen werden.
- 3. Kontamination der Serumproben oder Reagenzien durch Bakterien oder Pilze, oder die Kreuzkontamination von Reagenzien kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- 4. Deionisiertes Wasser mit Polyesterrückständen kann das Merretichperoxidaseenzym inaktivieren.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

GEBRAUCHSEIGENSCHAFTEN

Sensitivität

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

Hochdosis “hook“-Effekt

Dieser Test hat gezeigt,dass er keinen Hochdosis „Hook“-Effekt bis zu einer Konzentration von 1,000,000 ng/ml aufweist. Dieses ist wichtig, da einige Patienten mit Phäochromocytom über 300,000 ng/ml Chromogranin A Spiegel in ihren Serumproben aufwiesen.

Präzision

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

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

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

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

Linearität

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

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

Wiederfindung

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

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

Literatur

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

Testkurzprozedur

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

Revisionsdatum: 2009-06-03



Trousse ELISA chromogranine A humaine

fr

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

KAPEPKT812

DIAGNOSTIC IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

BUT DU DOSAGE

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

RÉSUMÉ DE LA PHYSIOLOGIE

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

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

PRINCIPE DE L'ANALYSE

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

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

RÉACTIFS: Préparation et conservation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Un flacon contenant 20 mL de tampon concentré trente fois. Avant utilisation, le contenu doit être dilué avec 580 mL d'eau distillée et bien mélangé. Une fois dilué, on obtient une solution de lavage de travail contenant un surfactant dans une solution saline tamponnée au phosphate avec un agent conservateur non-azoture. La solution diluée doit être conservée à température ambiante et est stable jusqu'à la date d'expiration inscrite sur la boîte d'emballage de la trousse.

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

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

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

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

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

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

9.

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

Contrôles 1 - 2

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

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

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

MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

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

PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON

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

PROCÉDURE D'ANALYSE

1. Préparation des réactifs

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

3. Procédure d'analyse

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

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

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

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

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

- Enlever l'adhésif pour plaque. Aspirer le contenu de chaque puits. Bien laver 5 fois en distribuant 350 µL de solution de lavage de travail dans chaque puits et aspirer ensuite complètement le contenu. Ou bien utiliser un laveur de plaques de microtitration automatique.
- Ajouter 100 µL de la solution de travail des anticorps de détection dilués à chacun des puits.
- Couvrir la plaque avec l'adhésif pour plaque et incuber sur un agitateur orbital (170 tpm) à température ambiante pendant 1 heure.
- Enlever l'adhésif pour plaque. Aspirer le contenu de chaque puits. Bien laver 5 fois en distribuant 350 µL de solution de lavage de travail dans chaque puits et aspirer ensuite complètement le contenu. Ou bien utiliser un laveur de plaques de microtitration automatique.
- Ajouter 100 µL de solution de substrat TMB dans chacun des puits.
- Couvrir la plaque avec un adhésif pour plaque plus une feuille d'aluminium pour éviter l'exposition à la lumière.
- Incuber la plaque à température ambiante pendant 20 minutes.
- Enlever la feuille d'aluminium et l'adhésif pour plaque. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt dans chacun des puits. Mélanger doucement.
- Lire l'absorbance à 450 nm dans les 10 minutes dans un lecteur de plaques de microtitration.
Note: afin de réduire le bruit de fond, on peut régler l'appareil pour une mesure en double à 450 nm avec une correction de longueur d'onde de bruit de fond réglée à 595 nm, 620 nm ou 630 nm.

NOTES DE PROCÉDURE

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

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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

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

PROTOCOLAGE DES RÉSULTATS

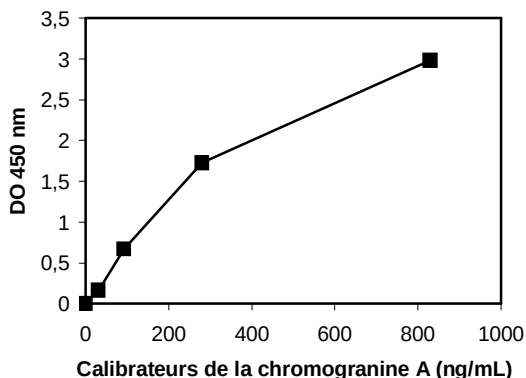
Le laboratoire devrait protocoler les résultats directs de l'analyse. Pour les échantillons montrant des valeurs élevées, il est fortement recommandé de diluer l'échantillon du patient à 1:100 avec le tampon d'analyse et de réanalyser l'échantillon dilué pour obtenir un résultat d'analyse plus précis.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

EXEMPLE DE DONNÉES ET DE COURBE DE CALIBRATION

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

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

ELISA chromogranine A humaine



VALEURS ATTENDUES

Le sérum de septante-deux adultes normaux a été analysé avec cet ELISA pour la chromogranine A humaine. Les valeurs normales étaient en dessous de 100 ng/mL. Cinq patients souffrant d'un phéochromocytome montraient un taux en chromogranine A supérieur à 100 ng/mL et l'un d'eux atteignait 300.000 ng/mL. Il est fortement recommandé que chaque laboratoire établisse son propre taux limite normal.

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

LIMITES DE LA PROCÉDURE

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

CONTRÔLE DE QUALITÉ

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

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité

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

Effet "crochet" à haute concentration

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

Précision

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

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

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

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

Linéarité

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

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

Épreuve de surcharge

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

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

Bibliographie

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

Résumé du protocole:

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

Date de révision: 2009-06-03

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibrateur zéro
	Calibrator #	Calibrateur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Buisjes	Röhrchen
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjugaat	HRP Konjugat
	HRP Conjugaat	HRP Konjugat
	HRP Conjugaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjugaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjugaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjugaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjugaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjugaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjugaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Limitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Inmunoadsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Polietileno-glicol	Polyetylglykol
	Solução de Extracção	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stopplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιχνηθέτης	Markør
	Ιχνηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Σωληνάριο	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλουσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	<u>Stosowane symbole</u>	<u>Használt szimbólumok</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáratí idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunadszorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietilén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extrakciós oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikropłytki	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>					
	Вижте инструкцията за работа					
	Температура на съхранение					
	Използвайте с					
	Партиден код					
	Каталожен номер					
	Контрол					
	Ин витро диагностично медицинско изделие					
	Производител					
	Съдържание достатъчно за <n> теста					
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	WASH	SOLN	CONC	Концентриран измиващ разтвор		
WASH	SOLN	CONC				
<table><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table>	CAL	0	Нулев калибратор			
CAL	0					
<table><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table>	CAL	N	Калибратор #			
CAL	N					
<table><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table>	CONTROL	N	Контрол #			
CONTROL	N					
<table><tr><td>Ag</td><td>125I</td></tr></table>	Ag	125I	Трейсър			
Ag	125I					
<table><tr><td>Ab</td><td>125I</td></tr></table>	Ab	125I	Трейсър			
Ab	125I					
<table><tr><td>Ag</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	125I	CONC	Концентриран маркер		
Ag	125I	CONC				
<table><tr><td>Ab</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	125I	CONC	Концентриран маркер		
Ab	125I	CONC				
	Епруветки					
<table><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table>	INC	BUF	Инкубационен буфер			
INC	BUF					
<table><tr><td>ACETONITRILE</td></tr></table>	ACETONITRILE	Ацетонитрил				
ACETONITRILE						
<table><tr><td>SERUM</td></tr></table>	SERUM	Серум				
SERUM						
<table><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table>	DIL	SPE	Разредител за пробите			
DIL	SPE					
<table><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table>	DIL	BUF	Буфер за разреждане			
DIL	BUF					
<table><tr><td>ANTISERUM</td></tr></table>	ANTISERUM	Антисерум				
ANTISERUM						
<table><tr><td>IMMUNOABSORBENT</td></tr></table>	IMMUNOABSORBENT	Имуноабсорбент				
IMMUNOABSORBENT						
<table><tr><td>DIL</td><td>CAL</td></tr></table>	DIL	CAL	Разредител за калибратора			
DIL	CAL					
<table><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table>	REC	SOLN	Пресъздаващ разтвор			
REC	SOLN					
<table><tr><td>PEG</td></tr></table>	PEG	Полиетилен гликол				
PEG						
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	EXTR	SOLN	Екстрактов разтвор			
EXTR	SOLN					
<table><tr><td>ELU</td><td>SOLN</td></tr></table>	ELU	SOLN	Разтвор за елюиране			
ELU	SOLN					
<table><tr><td>GEL</td></tr></table>	GEL	Силикагелни пълнители				
GEL						
<table><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table>	PRE	SOLN	Пред-лечебен разтвор			
PRE	SOLN					
<table><tr><td>NEUTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	NEUTR	SOLN	Неутрализиращ ратвор			
NEUTR	SOLN					
<table><tr><td>TRACEUR</td><td>BUF</td></tr></table>	TRACEUR	BUF	Маркерен буфер			
TRACEUR	BUF					
	Микротитърна пластина					
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table>	Ab	HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза			
Ab	HRP					
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td></tr></table>	Ag	HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза			
Ag	HRP					
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	HRP	CONC	HRP конюгиран концентрат		
Ab	HRP	CONC				
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	HRP	CONC	HRP конюгиран концентрат		
Ag	HRP	CONC				
<table><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table>	CONJ	BUF	Буфер за конюгата			
CONJ	BUF					
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table>	CHROM	TMB	CONC	Хромогенен TMB концентрат		
CHROM	TMB	CONC				
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table>	CHROM	TMB	Хромогенен TMB разтвор			
CHROM	TMB					
<table><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table>	SUB	BUF	Субстратен буфер			
SUB	BUF					
<table><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table>	STOP	SOLN	Стоп разтвор			
STOP	SOLN					
<table><tr><td>INC</td><td>SER</td></tr></table>	INC	SER	Инкубационен серум			
INC	SER					
<table><tr><td>BUF</td></tr></table>	BUF	Буфер				
BUF						
<table><tr><td>Ab</td><td>AP</td></tr></table>	Ab	AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза			
Ab	AP					
<table><tr><td>SUB</td><td>PNPP</td></tr></table>	SUB	PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат			
SUB	PNPP					
<table><tr><td>BIOT</td><td>CONJ</td><td>CONC</td></tr></table>	BIOT	CONJ	CONC	Биотин конюгиран концентрат		
BIOT	CONJ	CONC				
<table><tr><td>AVID</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	AVID	HRP	CONC	Авидин HRP концентрат		
AVID	HRP	CONC				
<table><tr><td>ASS</td><td>BUF</td></tr></table>	ASS	BUF	Буфер за пробите			
ASS	BUF					
<table><tr><td>Ab</td><td>BIOT</td></tr></table>	Ab	BIOT	Биотин конюгат			
Ab	BIOT					
<table><tr><td>Ab</td></tr></table>	Ab	специфично анти тяло				
Ab						
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	SAV	HRP	CONC	стрептавидин HRP концентрат		
SAV	HRP	CONC				
<table><tr><td>NSB</td></tr></table>	NSB	не специфично свързване				
NSB						
<table><tr><td>2nd Ab</td></tr></table>	2nd Ab	второ анти тяло				
2nd Ab						
<table><tr><td>ACID</td><td>BUF</td></tr></table>	ACID	BUF	киселинизиращ буфер			
ACID	BUF					