

Chromogranin A New Gen. ELISA

El producto Chromogranin A New Gen. ELISA es un kit para la detección enzimática cuantitativa de cromogranina A (CGA) humana en suero o en plasma con EDTA en adultos.

REF **30208352**

 **12x8**



EU: **IVD**  



Cisbio Bioassays
Parc Marcel Boiteux – BP 84175
30200 Codolet, France



IBL International GmbH
Flughafenstrasse 52a
22335 Hamburg, Germany

Tel.: +49 (0) 40 53 28 91-0
Fax: +49 (0) 40 53 28 91-11
IBL@tecan.com
www.tecan.com/ibl

Always there for you

1. NOMBRE Y USO PREVISTO

El producto **CHROMOGRANIN A NEW GEN. ELISA** es un kit para la detección enzimática cuantitativa de cromogranina A (CGA) humana en suero o en plasma con EDTA en adultos.

El kit **CHROMOGRANIN A NEW GEN. ELISA** está destinado a utilizarse como ayuda al diagnóstico en la determinación de la presencia y progresión de las neoplasias neuroendocrinas (NNE) de tipo GEP (gastroenteropancreático) en adultos.

El kit está destinado a un uso manual y profesional.

2. INTRODUCCIÓN

La CGA es una proteína ácida e hidrofílica de 439 aa (49 kD) que se encuentra en los gránulos cromafines de las células neuroendocrinas. Pertenece a la familia de las graninas. La CGA actúa como prohormona. Su proteólisis es un elemento clave de su fisiología. Al degradarse libera péptidos biológicamente activos (vasostatina, cromostatina, pancreastatina, parastatina) que tienen diferentes funciones paracrina y autocrina. Esta proteólisis es específica de cada tejido y la fragmentación de la proteína será diferente según su ubicación. Tiene lugar principalmente en la célula, dentro de los gránulos cromafines. En inmunohistoquímica, la presencia de CGA en células tumorales apunta a un origen neuroendocrino del tumor. Existe CGA circulante en las personas sanas, en concentraciones que son independientes de la edad y del sexo. La determinación de CGA en muestras de suero ha demostrado tener relevancia para los cánceres endocrinos, con elevaciones especialmente significativas en los tumores endocrinos gastroenterohepáticos. Varios estudios han demostrado que los niveles de CGA circulantes están asociados a la diferenciación neuroendocrina y vinculados a la masa tumoral, aunque sin sustituir a secreciones más específicas.

3. PRINCIPIO

El kit **CHROMOGRANIN A** es un inmunoensayo de tipo ELISA. Un primer anticuerpo monoclonal, inmovilizado en la microplaca, captura las proteínas CGA de los calibradores y de las muestras. Tras el lavado, las proteínas capturadas son reconocidas por un segundo anticuerpo monoclonal, conjugado con HRP (peroxidasa de rábano). Después de una segunda incubación, los reactivos no unidos se eliminan mediante lavado. A continuación se inicia la reacción colorimétrica añadiendo un sustrato de HRP: TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). Cuando la reacción se detiene, se lee la densidad óptica (DO) de cada pocillo a 450 nm. Los valores de DO medidos son proporcionales a la concentración de CGA de las muestras y calibradores.

4. REACTIVOS

Cada kit contiene suficientes reactivos para 96 análisis (incluyendo la generación de la curva de calibración). La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta exterior.

REACTIVOS	SÍMBOLOS	CANTIDAD	CONSERVACIÓN
MICROPLACA: Listo para usar. Anticuerpo murino monoclonal anti-CGA unido al fondo del pocillo. Albúmina bovina.	MICROPLATE	1 placa con 96 pocillos	Antes de la apertura: 2-8 °C hasta la fecha de caducidad. Después de la apertura: las tiras no utilizadas pueden guardarse durante 6 semanas en la bolsa de plástico suministrada, debidamente cerrada y con desecante, dentro del plazo indicado por la fecha de caducidad.
CONJUGADO: Listo para usar Anticuerpo murino monoclonal anti-CGA acoplado a HRP. Inmunoglobulinas murinas no inmunizadas, estabilizantes y conservante.	CONJ	1 vial 22 ml	Antes de la apertura: 2-8 °C hasta la fecha de caducidad. Después de la apertura: el conjugado puede guardarse a 2-8 °C durante 6 semanas, dentro del plazo indicado por la fecha de caducidad.
CALIBRADORES: Liofilizados. CGA recombinante humana, suero humano, EDTA, conservante. 75 – 140 – 300 – 600 – 1000 ng/ml* Reconstituya con 0,25 ml de agua destilada.	CAL	5 viales	Antes de la apertura: 2-8 °C hasta la fecha de caducidad. Después de la reconstitución: no deben permanecer a temperatura ambiente durante más de una hora; deben separarse en alícuotas y pueden mantenerse congelados a -20 °C durante 6 semanas, dentro del límite señalado por la fecha de caducidad.
CONTROLES: Liofilizados. CGA recombinante humana, suero humano, EDTA,	CONTROL	2 viales	Antes de la apertura: 2-8 °C hasta la fecha de caducidad.

conservante. 90 – 720 ng/ml** Reconstituya con 0,25 ml de agua destilada.			Después de la reconstitución: no deben permanecer a temperatura ambiente durante más de una hora; deben separarse en alícuotas y pueden mantenerse congelados a –20 °C durante 6 semanas, dentro del límite señalado por la fecha de caducidad.
DIL/CAL0: Listo para usar. Este reactivo se utiliza como tampón de incubación, diluyente y calibrador 0. Tampón, suero bovino, azida sódica, EDTA.	DIL CAL 0	1 vial 80 ml	Antes de la apertura: 2-8 °C hasta la fecha de caducidad. Después de la apertura: el diluyente/CAL0 puede guardarse a 2-8 °C durante 6 semanas, dentro del plazo indicado por la fecha de caducidad.
TWEEN 20: Solución de lavado concentrada Diluya 9 ml de Tween 20 en 3 l de agua destilada. Agite suavemente.	TWEEN 20	1 vial 10 ml	Antes de la apertura: 2-8 °C hasta la fecha de caducidad. Después de la apertura: el Tween 20 puede guardarse a 2-8 °C durante 6 semanas, dentro del plazo indicado por la fecha de caducidad.
SUSTRATO: Listo para usar 3,3',5,5'-tetrametilbencidina: TMB	SUBS TMB	1 vial 15 ml	Antes de la apertura: 2-8 °C hasta la fecha de caducidad. Después de la apertura: la TMB puede conservarse a 2-8 °C durante 6 semanas, dentro del plazo indicado por la fecha de caducidad.
SOLUCIÓN DE PARADA: Listo para usar Ácido sulfúrico 0,5 M.	STOP SOLN	1 vial 22 ml	Antes de la apertura: 2-8 °C hasta la fecha de caducidad. Después de la apertura: la solución de parada puede guardarse a 2-8 °C durante 6 semanas, dentro del plazo indicado por la fecha de caducidad.
PELÍCULA ADHESIVA PARA LA MICROPLACA		3	
BOLSA DE PLÁSTICO		1	

(*)Estos valores son solo valores objetivo; los valores reales se indican en las etiquetas de los viales.

(**) Los valores límite de aceptación reales están indicados en la etiqueta de los viales.

5. PRECAUCIONES DE USO

5.1. Medidas de seguridad

- Las materias primas de origen humano que contienen los reactivos de este kit se han analizado con kits aprobados y han dado un resultado negativo para anticuerpos anti-VIH 1, anti-VIH 2 y anti-VHC y para el antígeno HBs. Sin embargo, dado que es imposible garantizar plenamente que dichos productos no transmitan la hepatitis, el VIH o cualquier otra infección vírica, todas las materias primas de origen humano, incluidas las muestras que se van a analizar, deben tratarse como potencialmente infecciosas.
- No pipetee con la boca.
- No fume, coma ni beba en zonas donde se manipulen muestras o reactivos del kit. Utilice guantes desechables para manipular los reactivos del kit y las muestras y lávese concienzudamente las manos al terminar. Evite las salpicaduras.
- Descontamine y elimine las muestras y todos los materiales que puedan estar contaminados como si contuvieran agentes infecciosos. El mejor método de descontaminación es en autoclave a 121,5 °C durante 1 hora como mínimo.
- La azida sódica puede reaccionar con los tubos de plomo o cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas.
- Al eliminar residuos, dilúyalos de forma exhaustiva para evitar la formación de dichas sustancias.



CAL **CONTROL** **CONJ**

ADVERTENCIA

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel

STOP **SOLN**

No está clasificada como peligrosa, pero la solución tiene un pH ácido

DIL	CAL	0
-----	-----	---

Contiene azida sódica (< 0,1%)

5.2. Precauciones de manipulación

- No utilice los componentes del kit después de su fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de lotes distintos.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos y del agua. Respete los tiempos de incubación.

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

6.1 Fase preanalítica

El ensayo se realiza directamente en suero o en plasma con EDTA. Para realizar el análisis en un plazo de 4 horas, las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente (18-25 °C). Para efectuar el análisis en un plazo de 48 horas, las muestras deben conservarse a 2-8 °C después de la toma de muestras. Para un análisis que vaya a realizarse al cabo de 48 horas o más, las muestras deben dividirse en alícuotas, que deben congelarse a -20 °C y pueden utilizarse en un plazo de 10 meses.

Dilución: Si se sospecha que los niveles de CGA pueden ser elevados, la dilución debe realizarse con el tampón diluyente suministrado con el kit. Se recomienda efectuar las diluciones en tubos de plástico desechables.

6.2 Predilución de las muestras, controles y calibradores (a 1/51)

- **Todas las muestras, controles y calibradores deben prediluirse 51 veces** mediante el diluyente

DIL	CAL
-----	-----

 0 incluido con el kit antes de analizarlos. Mezcle suavemente la mezcla en un vórtex.

7. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

7.1 Equipo necesario

- Micropipetas de precisión, o instrumental similar, con puntas desechables para dispensar 20, 50, 100, 200 y 1000 µl. Debe verificarse periódicamente que estén calibradas.
- Agua destilada.
- Tubos de plástico desechables.
- Mezclador vórtex.
- Lavador de microplacas (opcional).
- Agitador de microplacas.
- Lector de microplacas que mida la absorbancia a 450 nm. Opcionalmente, el lector puede estar equipado con un filtro que lea la absorbancia a una longitud de onda entre 610 nm y 650 nm (se recomienda 620 nm). Esta segunda lectura permite corregir las imperfecciones de la microplaca.

7.2 Protocolo

- Todos los reactivos deben llevarse a temperatura ambiente (18-25 °C) al menos 30 minutos antes de utilizarlos. Los reactivos deben pipetearse y dispensarse en los pocillos a temperatura ambiente (18-25 °C).
- Todos los calibradores, controles y muestras debe analizarse por duplicado.
- Reconstituya los viales de los calibradores y de los controles. Compruebe cuidadosamente que todo el producto liofilizado esté disuelto y utilícelo en el plazo de 1 hora tras reconstituirlo.

7.2.1 Preparación de la solución de lavado **TWEEN 20**

- Para obtener resultados fiables y reproducibles, se recomienda efectuar los pasos de lavado tal como se indica; el volumen residual de la solución de lavado debe ser tan pequeño como sea posible. Se recomienda usar un lavador de microplacas.
 - Para preparar la solución de lavado, diluya 9 ml de Tween 20 **TWEEN 20** en 3 l de agua destilada. Mezcle lentamente.

7.2.2 Instrucciones [Debe respetarse el orden de adición de los reactivos]

Puede consultar la ficha del protocolo de laboratorio en la última página de este documento. Es necesario leer atentamente todo el prospecto antes de usar la ficha del protocolo de laboratorio.

1. Prepare e identifique una cantidad suficiente de tubos de ensayo para realizar una predilución de las muestras, los calibradores y los controles.
2. Determine cuántas tiras de pocillos de microtitulación necesitará para el análisis. Quite las tiras no utilizadas del soporte de tiras y consérvelas a 2-8 °C en la bolsa con cierre adhesivo, debidamente sellada y con desecante.
3. **Prediluya los calibradores, muestras y controles a 1:51 en tubos de plástico.**
 - a. Dispense 1 ml de diluyente **DIL CAL** 0 en los tubos de plástico.
 - b. Añada 20 µl de cada calibrador, control o muestra y mezcle suavemente en un vórtex.
4. Dispense 200 µl de los calibradores, **CAL**, muestras o controles **CONTROL** prediluidos a 1/51 mediante DIL/CAL0 **DIL CAL** 0 en cada pocillo.
5. Cubra con película adhesiva y agite durante **1 h a 700 rpm**, a temperatura ambiente (**18-25 °C**).
6. Lave los pocillos tal como se indica a continuación:
 - a. Elimine el contenido de los pocillos.
 - b. Dispense 300 µl de solución de lavado **TWEEN 20**, preparada tal como se explica en el apartado 7.2.1.
 - c. Repita los pasos a y b dos veces más, para un total de 3 ciclos de lavado.
 - d. Finalmente, aspire. El volumen residual de la solución de lavado debe ser tan pequeño como sea posible. Se puede golpear suavemente la placa boca abajo para eliminar el líquido residual.
7. Dispense **200 µl** de conjugado de HRP **CONJ** en todos los pocillos.
8. Cubra con película adhesiva e **incube durante 2 h +/- 5'** a temperatura ambiente (18-25 °C), **con agitación a 700 rpm**.
9. Lave los pocillos tal como se indica más arriba. A continuación:
10. Dispense 100 µl de TMB **SUBS TMB** en todos los pocillos. Cubra con película adhesiva. No es necesario incubar en la oscuridad.
11. Deje que la reacción colorimétrica se desarrolle **durante exactamente 10 minutos** a temperatura ambiente (18-25 °C), **con agitación (a 700 rpm)**.
12. Detenga la reacción añadiendo 50 µl de solución de parada **STOP SOLN** a todos los pocillos.
 - Lea la absorbencia a 450 nm. Realice una segunda lectura (opcional) de la absorbencia a una longitud de onda entre 610 nm y 650 nm.

8. CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio (BPL) requieren usar muestras de control de calidad en cada serie de análisis para verificar la calidad de los resultados obtenidos. Todas las muestras se deben tratar de forma idéntica y se recomienda analizar los resultados usando los métodos estadísticos apropiados.

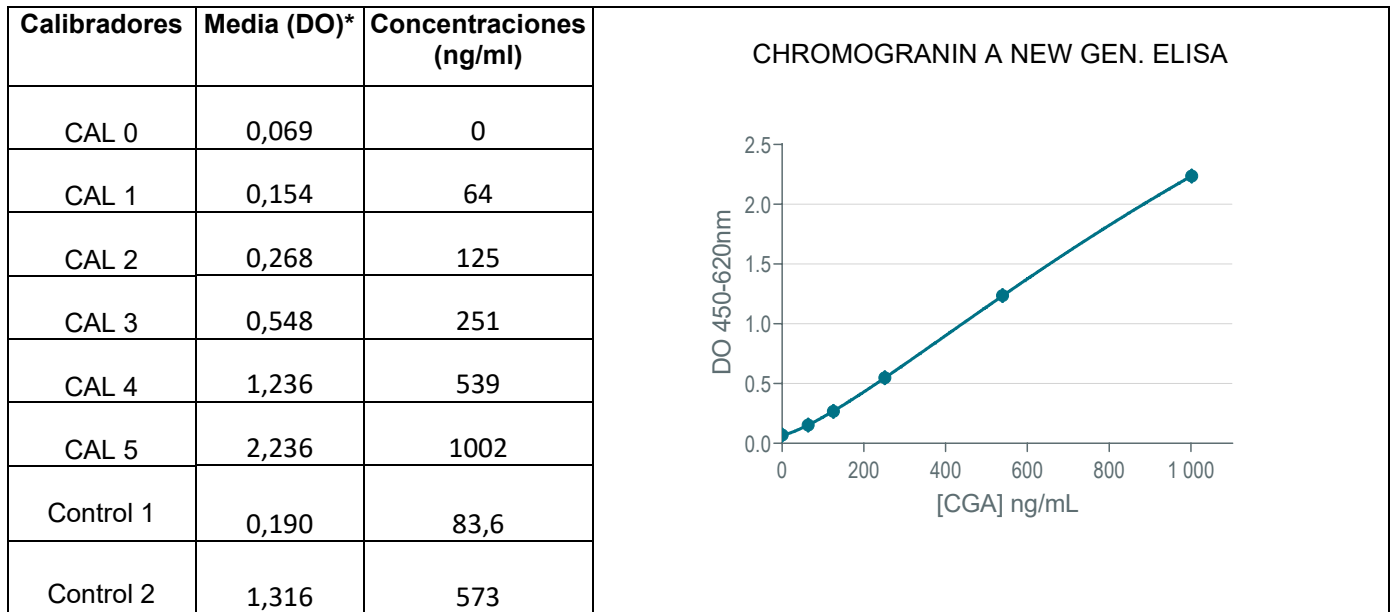
9. RESULTADOS

1. Corrección opcional de la DO:* reste las lecturas a 620 nm de las lecturas a 450 nm.
2. Para cada duplicado, calcule la absorbancia (DO) media de los calibradores, los controles y las muestras.
3. Elabore una curva de calibración representando los valores medios (corregidos*) de DO a 450 nm de los calibradores (eje y) respecto a su concentración (eje x) indicada en el vial.

4. Para las curvas de calibración, se recomienda usar el modelo de ajuste matemático logístico de cuatro parámetros (4PL) con una ponderación de $1/y^2$. Otros modelos de reducción de datos pueden dar resultados ligeramente distintos.

Lea la concentración de las muestras en la curva. La ratio de predilución 1:51 ya está calculada en las concentraciones del calibrador.

Ejemplo de datos de análisis: este ejemplo es meramente ilustrativo y en ningún caso debe sustituirse por los resultados obtenidos en el laboratorio.



10. LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- Las muestras con turbidez, hemólisis o hiperlipidemia o que contengan fibrina pueden dar resultados imprecisos.
- No extrapole los valores de las muestras más allá del último patrón. Diluya las muestras de concentración elevada y vuelva a analizarlas.
- No utilice el kit CHROMOGRANIN A NEW GEN. ELISA para la determinación de CGA circulante en pacientes sometidos a tratamientos en curso con inhibidores de la bomba de protones o en pacientes con insuficiencia renal o gastritis atrófica. Estos pacientes presentan niveles fisiológicos elevados de CGA circulante no vinculados a la presencia de un tumor neuroendocrino.
- No interprete los resultados en pacientes que reciben tratamiento con análogos de la somatostatina, ya que estos pacientes pueden presentar resultados falsamente bajos.

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

11.1 Imprecisión

Muestras	n	Concentración Media (ng/ml)	Intraserie (CV en %)
1	34	81,6	6,43
2	36	122	4,68
3	31	182	4,13
4	35	407	3,19
5	36	445	3,98
6	35	632	4,73

Muestras	n	Concentración Media (ng/ml)	Interserie (CV en %)
1	28	51,3	11,5
2	28	187	6,4
3	28	442	6,8
4	20	697	7,0

11.2 Prueba de recuperación

Se añadieron cantidades conocidas de CGA a sueros humanos. Los porcentajes de recuperación en las muestras oscilaron entre el 90% y el 110%.

11.3 Prueba de dilución

Las muestras con concentraciones elevadas se diluyeron. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron del 80% al 120%.

11.4 Especificidad

No se observaron interferencias al analizar muestras de suero con cualquiera de las siguientes sustancias:

- Glucagón (hasta 3000 ng/ml)
- Gastrina (hasta 3000 ng/ml)
- Cromogranina B (hasta 3000 ng/ml)
- ENE (hasta 3000 ng/ml)
- Polipéptido pancreático (hasta 3000 ng/ml)

11.5 Intervalo de medición

Las muestras deben medirse en el intervalo comprendido entre el límite de cuantificación y la concentración más alta del intervalo de calibración, es decir, entre 30,6 ng/ml y 1000 ng/ml.

11.6 Límite de detección

El límite de detección (LD o sensibilidad analítica) del kit CHROMOGRANIN A NEW GEN. ELISA se define como la concentración detectable más baja diferente de 0 con una probabilidad del 95 % que se ha calculado añadiendo 2 desviaciones estándar a la media de 30 análisis replicados del calibrador cero (CAL0). Se obtuvo el valor de 16,9 ng/ml.

La sensibilidad funcional se define como la concentración medida por el perfil de imprecisión con un CV del 20%. Se estima que es 30,6 ng/ml.

11.7. Efecto gancho

No se produce efecto gancho hasta 1 000 000 ng/ml.

11.8. Interferencia

- Cuando se sigue el protocolo de ensayo indicado en las instrucciones de uso, no se observa interferencia con biotina en concentraciones de 0 ng/ml a 600 ng/ml.
- NOTA: Los resultados mostraron que una concentración de biotina de 1200 ng/ml provoca una ligera interferencia (-14% de sesgo máximo) con el kit CHROMOGRANIN A NEW GEN. ELISA.
- No se observó interferencia con **bilirrubina y hemoglobina** en concentraciones de hasta 0,15 mg/ml y 2 mg/ml, respectivamente.
- No se observaron interferencias al analizar muestras de suero suplementadas con triglicéridos procedentes de una muestra humana hiperlipidémica (743,4 mg/dl de TG totales).

ATENCIÓN: El inmunoensayo está protegido contra posibles interferencias con **anticuerpos heterófilos**, como HAMA y factores reumatoides (FR), mediante la adición de un protector (inmonoglobulinas murinas no específicas). Sin embargo, no podemos asegurar que no se obtenga nunca un falso positivo o un falso negativo debido a la presencia de anticuerpos heterófilos y factores reumatoides en las muestras de los pacientes.

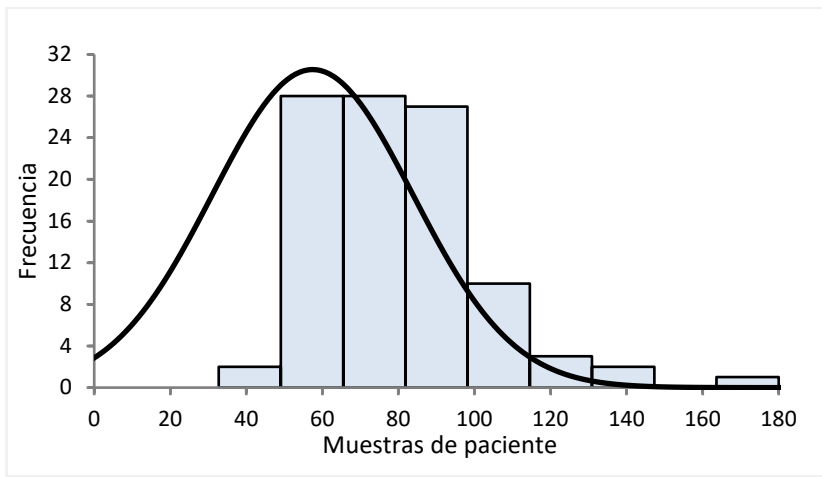
12. VALORES NORMALES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio determine su propio intervalo de valores normales según el tipo de muestra utilizado habitualmente. La cromogranina A es una proteína que se une al calcio y sus niveles circulantes se ven afectados por la concentración de Ca⁺⁺. Los valores humanos normales obtenidos pueden ser diferentes según si se analiza suero recogido en tubos de extracción de sangre secos o plasma con EDTA.

Los valores que se presentan a continuación son meramente indicativos y se han obtenido a partir de muestras de suero de una población de 101 sujetos presuntamente sanos.

Para la distribución de valores normales que figura a continuación, el percentil 95 corresponde a 101 ng/ml.

Referencia del documento: 03 – Noviembre de 2022



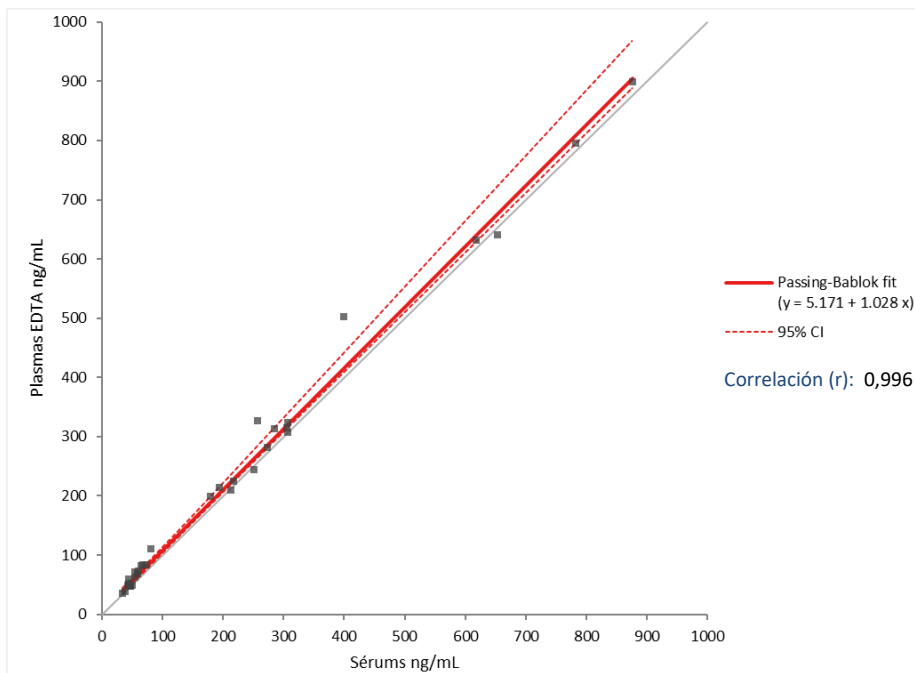
Valores normales en muestras de plasma con EDTA:

La correlación suero/plasma que se presenta a continuación debe utilizarse para determinar la concentración plasmática de CGA.

La ecuación de la correlación es la siguiente:

$$[\text{Muestra de plasma}] = 1,028 \times [\text{Muestra de suero}] + 5,171$$

Para extrapolar los valores del plasma con EDTA, esta ecuación debe aplicarse a los valores normales obtenidos para las muestras de suero.



13. BIBLIOGRAFÍA

Zhang C et al.

Serum chromogranin A for the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms and its association with tumour expression.

Oncology Letters 17: 1497-1504, 2019.

Jun E et al.

Diagnostic value of chromogranin A in pancreatic neuroendocrine tumors depends on tumor size: A prospective observational study from a single institute.

Surgery. Julio de 2017; 162(1):120-30

Rogowski W et al.

Baseline chromogranin A and its dynamics are prognostic markers in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.

Future Oncol. 2017; 13(12):1069-79

Cheng Y et al.

Serum chromogranin A levels for the diagnosis and follow-up of well-differentiated non-functioning neuroendocrine tumors.

Tumour Biology. 2016; 37(3):2863-9

d'Herbomez M et al.

Biomarkers of neuroendocrine tumors.

Ann Biol Clin. 2016; 74(6):669-79.

Erickson JA et al.

A chromogranin A ELISA absent of an apparent high-dose hook effect observed in other chromogranin A ELISAs.

Clin Chim Acta. 2016; 452:120-3

Gut P et al.

Chromogranin A - unspecific neuroendocrine marker. Clinical utility and potential diagnostic pitfalls.

Arch Medical Sci: AMS. 2016; 12(1):1-9

Kim M et al.

The Role of Plasma Chromogranin A as Assessment of Treatment Response in Non-functioning Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors.

Cancer Res Treat. 2016; 48(1):153-61

Lyubimova NV et al.

Chromogranin As a Biochemical Marker of Neuroendocrine Tumors.

Bull Exp Biol Med. 2016; 160(5):702-4

Shanahan MA et al.

Chromogranin A predicts survival for resected pancreatic neuroendocrine tumors.

J Surg Res. 2016; 201(1):38-43

Glinicki P et al.

Comparison of chromogranin A (CgA) levels in serum and plasma (EDTA2K) and the respective reference ranges in healthy males.

Endokrynol Pol. 2015; 66(1):53-6.

Hallet J et al.

Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: a population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes.

Cancer. 2015; 121(4):589-97

Han X et al.

The value of serum chromogranin A as a predictor of tumor burden, therapeutic response, and nomogram-based survival in well-moderate nonfunctional pancreatic neuroendocrine tumors with liver metastases.

Eur J Gastroenterol Hepatol. 2015; 27(5):527-35.

Kim M et al.

The Role of Plasma Chromogranin A as Assessment of Treatment Response in Non-functioning Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors.

Cancer Res Treat. 2016; 48(1):153-61

Attwood SE et al.

Long-term safety of proton pump inhibitor therapy assessed under controlled, randomised clinical trial conditions: data from

the SOPRAN and LOTUS studies.

Aliment Pharmacol Ther. 2015; 41(11):1162-74.

Rehfeld JF.

Chromogranin A in gastrinomas: Promises and pitfalls.

Clin Chim Acta. 2015; 15; 446:15-20.

P Glinicki et al.

Chromogranin A (CgA): structure, biological function, pre-analytical, analytical, and clinical aspects of its measurement in blood

Postepy Nauk Medycznych. 2014; XXVII(12):847-51.

Piotr Glinicki et al.

Comparison of chromogranin A levels in serum and plasma (EDTA2K) and the respective reference ranges in healthy males

Endocrine Abstracts. 2014; (35):532

Hijioka M et al.

Serum chromogranin A is a useful marker for Japanese patients with pancreatic neuroendocrine tumors.

Cancer Sci. 2014; 105(11):1464-71.

Modlin IM et al.

Neuroendocrine tumor biomarkers: current status and perspectives.

Neuroendocrinology. 2014; 100(4):265-77.

Onal IK et al.

Chromogranin A as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease.

Scand J Gastroenterol. 2014; 49(12):1501-2.

Pedersen L et al.

Preanalytical factors of importance for measurement of Chromogranin A.

Clin Chim Acta. 2014; 436:41-4.

Chromogranin A New Gen. ELISA

FICHA DEL PROTOCOLO DE LABORATORIO

No utilice esta ficha sin haber leído antes todo el prospecto.

➡ **Prediluya** los calibradores, las muestras y los controles en tubos de plástico a 1:51.

TECAN.



Predilución a 1:51

1. **DISPENSE** 1 ml de diluyente en los tubos de plástico

DIL CAL 0

2. **AÑADA** 20 µl de cada calibrador, control o muestra y mezcle suavemente en un vórtex.

CAL CONTROL

3. **DISPENSE LAS MUESTRAS EN LA MICROPLACA**

CAL CONTROL

↓ Dispense 200 µl de los **calibradores, muestras o controles prediluidos a 1/51** con DIL/CAL0 en cada pocillo (distribución por duplicado).

+ 200 µl



4. **AGITACIÓN**

↓ Cubra con película adhesiva y **agite durante 1 h a 700 rpm** a temperatura ambiente (18-25 °C).

↻ 700 rpm

1 h



5. **LAVE LOS POCILLOS** (véase el apartado 7.2.1)

TWEEN 20

Prepare la solución de lavado diluyendo 9 ml de Tween 20 en 3 l de agua destilada.

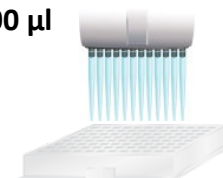
Elimine el contenido de los pocillos.

Dispense 300 µl de la solución de lavado preparada en cada pocillo.

Repita los pasos dos veces más, para un total de 3 ciclos de lavado.

Finalmente, aspire. El volumen residual de la solución de lavado debe ser tan pequeño como sea posible. Se puede golpear suavemente la placa boca abajo para eliminar el líquido residual.

3 x 300 µl



6. **DISPENSE EL CONJUGADO**

CONJ

Dispense 200 µl de conjugado de HRP en todos los pocillos.

+ 200 µl



7. **INCUBE**

Cubra con película adhesiva e incube durante **2 h +/- 5'** a temperatura ambiente (18-25 °C), con **agitación a 700 rpm**.

↻ 700 rpm

2 h +/- 5'



8. **LAVE LOS POCILLOS** (véase el apartado 7.2.1)

TWEEN 20

Prepare la solución de lavado diluyendo 9 ml de Tween 20 en 3 l de agua destilada.

Elimine el contenido de los pocillos.

Dispense 300 µl de la solución de lavado preparada en cada pocillo.

Repita los pasos dos veces más, para un total de 3 ciclos de lavado.

Finalmente, aspire. El volumen residual de la solución de lavado debe ser tan pequeño como sea posible. Se puede golpear suavemente la placa boca abajo para eliminar el líquido residual.

3 x 300 µl



9. **DISPENSE EL SUSTRATO**

SUBS TMB

↓ Dispense 100 µl de TMB en todos los pocillos. Cubra con película adhesiva. No es necesario incubar en la oscuridad. Deje que la reacción colorimétrica se desarrolle **durante exactamente 10 minutos** a temperatura ambiente (18-25 °C), con **agitación a 700 rpm**.

+ 100 µl

↻ 700 rpm

10 min



10. **DISPENSE LA SOLUCIÓN DE PARADA**

STOP SOLN

↓ Detenga la reacción añadiendo 50 µl de solución de parada en todos los pocillos.

+ 50 µl



11. **LECTURA**

⬆ Lea la absorbancia a **450 nm**. Realice una segunda lectura (opcional) de la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm (entre 610 nm y 650 nm).

Utilice un **ajuste logístico de 4 parámetros equilibrado** para la interpolación de datos.

450 nm



Cisbio Bioassays - Parc Marcel Boiteux - BP 84175 - 30200 Codolet / France

Phone: +33 (0) 4 66 79 68 32 - Fax: +33 (0) 4 66 79 67 50 - E-mail: Cisbio.iva@PERKINELMER.com

IBL International GmbH - Flughafenstrasse 52a - 22335 Hamburg, Germany

Phone: +49 (0) 40 53 28 91-0 - Fax: +49 (0) 40 53 28 91-11 - E-mail: IBL@tecan.com; www.tecan.com/ibl