

REF

CGA-ELISA-NG

www.cisbio.com/ivd-pi

Notice d'utilisation - FRA



Référence du document : 04 – Février 2023

1. NOM ET INDICATION

Le kit CGA-ELISA-NG est une trousse pour le dosage enzymatique quantitatif de la chromogranine A humaine (CGA) dans le sérum ou le plasma EDTA chez l'adulte.

Le kit CGA-ELISA-NG est destiné à être utilisé en tant qu'aide au diagnostic dans la détermination de la présence et de l'évolution de néoplasmes neuroendocrines (NNE) de type GEP (Gastro-Entéro-Pancréatiques) chez le sujet adulte.

La trousse est destinée à un usage professionnel et à une utilisation manuelle.

2. INTRODUCTION

La CGA est une protéine hydrophile et acide de 439 aa (49 kD) présente dans les granules chromaffines des cellules neuroendocrines. Elle fait partie de la famille des granines.

La CGA agit comme une pro-hormone. En effet, sa protéolyse constitue un élément clé de sa physiologie. Cette dégradation libère des peptides biologiquement actifs (vasostatines, chromostatine, pancréastatine, parastatine) qui possèdent des fonctions paracrines et autocrines différentes. Cette protéolyse est tissu-spécifique et, suivant sa localisation, la fragmentation de la protéine sera différente. Elle a lieu principalement dans la cellule, à l'intérieur des granules chromaffines. En immunohistochimie, la présence de CGA dans les cellules tumorales fait suspecter une origine neuroendocrine de la tumeur. La CGA circulante existe chez les sujets sains et les valeurs obtenues sont indépendantes de l'âge et du sexe. L'intérêt du dosage sérique de la CGA a été démontré pour les cancers endocrines, avec des élévations de taux particulièrement significatives dans les tumeurs endocrines gastro-entéro-hépatiques. Des études ont montré que les taux de CGA circulante étaient associés à une différenciation neuroendocrine et liés à la masse tumorale, sans pour autant se substituer à des sécrétions plus spécifiques.

3. PRINCIPE

La trousse CHROMOGRANINE A est un immunodosage de type ELISA. Un premier anticorps monoclonal, immobilisé sur la microplaque, capture les protéines CGA contenues dans les calibrateurs et les échantillons. Après lavages, les protéines fixées sont reconnues par un second anticorps monoclonal conjugué à l'HRP (Horse-Radish-Peroxidase). Après une seconde incubation, les réactifs non fixés sont éliminés par lavage, puis la réaction colorimétrique est démarrée par addition d'un substrat de l'HRP, le TMB (3, 3', 5, 5' Tetramethyl benzidine). Après arrêt de la réaction, la densité optique (DO) de chaque puits est lue à 450 nm. Les DO mesurées sont proportionnelles à la concentration de CGA contenue dans les calibrateurs et les échantillons.

4. RÉACTIFS

Chaque trousse contient les réactifs suffisants pour 96 tests (incluant la génération de la courbe de calibration). La date de péremption est indiquée sur l'étiquette extérieure.

REACTIFS	SYMBOLES	QUANTITE	CONSERVATION
MICROPLAQUE : Prête à l'emploi. Anticorps monoclonal de souris anti-CGA fixé au fond du puits, Albumine bovine.	MICROPLATE	1 plaque de 96 puits	Avant ouverture : 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, les barrettes non utilisées, doivent être stockées dans le sachet plastique fourni, avec un agent desséchant, et correctement scellé pendant 6 semaines, dans la limite de la date de péremption.
CONJUGUE : Prêt à l'emploi Anticorps monoclonal de souris anti-CGA couplé à l'HRP, Immunoglobulines de souris non immunisées, stabilisateurs, conservateur.	CONJ	1 flacon de 22 mL	Avant ouverture : 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le conjugué peut être conservé pendant 6 semaines à 2-8°C, dans la limite de la date de péremption.
CALIBRATEURS : Lyophilisés. CGA humaine recombinante, sérum humain, EDTA, conservateur. 75 – 140 – 300 – 600 – 1000 ng /mL * Reconstituer avec 0,25 mL d'eau distillée	CAL	5 flacons	Avant ouverture : 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Après reconstitution, ne pas conserver plus d'une heure à température ambiante, aliquoter et congeler à - 20°C pour une durée de 6 semaines, dans la limite de la date de péremption.
CONTROLES : Lyophilisés. CGA humaine recombinante, sérum humain, EDTA, conservateur. 90 - 720 ng/mL ** Reconstituer avec 0,25 mL d'eau distillée	CONTROL	2 flacons	Avant ouverture : 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Après reconstitution, ne pas conserver plus d'une heure à température ambiante, aliquoter et congeler à - 20°C pour une durée de 6 semaines, dans la limite de la date de péremption.
DIL/CAL0 : Prêt à l'emploi. Ce réactif sert de tampon d'incubation, de diluant et de calibrateur 0. Tampon, sérum de bœuf, azoture de sodium, EDTA.	DIL CAL 0	1 flacon de 80 mL	Avant ouverture : 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le Diluant/CAL 0 peut être conservé pendant 6 semaines à 2-8°C, dans la limite de la date de péremption
TWEEN 20 : Solution de lavage concentrée Diluer 9 mL de tween 20 dans 3 litres d'eau distillée. Agiter doucement	TWEEN 20	1 flacon de 10 mL	Avant ouverture : 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le TWEEN peut être conservé pendant 6 semaines à 2-8°C, dans la limite de la date de péremption
SUBSTRAT : Prêt à l'emploi 3, 3', 5, 5' Tétraméthyl benzidine : TMB	SUBS TMB	1 flacon de 15 mL	Avant ouverture : 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le TMB peut être conservé pendant 6 semaines à 2-8°C, dans la limite de la date de péremption
SOLUTION D'ARRÊT : Prête à l'emploi. Acide sulfurique 0,5 M.	STOP SOLN	1 flacon de 22 mL	Avant ouverture : 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, la solution d'arrêt peut être conservée pendant 6 semaines à 2-8°C, dans la limite de la date de péremption
FILM ADHESIF POUR MICROPLAQUE		3	
SACHET PLASTIQUE		1	

(*) Les valeurs indiquées ci-dessus sont les valeurs cibles, les valeurs réelles sont indiquées sur les étiquettes des flacons.

(**) Les valeurs réelles de limite d'acceptation sont indiquées sur les étiquettes des flacons.

5. PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

5.1. Mesures de sécurité

- Les matières premières d'origine humaine contenues dans les réactifs de cette trousse ont été testées avec des trousse agrées et trouvées négatives en ce qui concerne les anticorps anti-HIV 1, anti-HIV 2, anti-HCV et l'antigène HBs. Cependant aucune méthode d'analyse ne permet à ce jour de garantir totalement qu'une matière première d'origine humaine soit incapable de transmettre l'hépatite, le virus HIV, ou toute autre infection virale. Aussi faut-il considérer toute matière première d'origine humaine, y compris les échantillons à doser, comme potentiellement infectieuse.
- Ne pas effectuer les pipetages à la bouche.
- Ne pas fumer, boire ou manger dans les locaux où l'on manipule les échantillons ou les réactifs. Porter des gants à usage unique pendant la manipulation des réactifs ou des échantillons et se laver soigneusement les mains après. Eviter de provoquer des éclaboussures.
- Eliminer les échantillons et décontaminer tout le matériel susceptible d'avoir été contaminé comme s'ils contenaient des agents infectieux. La meilleure méthode de décontamination est l'autoclavage pendant au moins une heure à 121,5°C.
- L'azoture de sodium peut réagir avec les canalisations de plomb et de cuivre pour former des azotures de métaux fortement explosifs.
- Lors de l'évacuation des déchets, les diluer abondamment pour éviter la formation de ces produits.



CAL CONTROL CONJ

AVERTISSEMENT

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée

STOP SOLN

Non classé dangereux mais solution avec PH acide

DIL CAL 0

Contient du sodium azide (<0.1%)

5.2. Précautions de manipulation

- Ne pas utiliser les composants de la trousse au-delà de la date de péremption.
- Ne pas mélanger les réactifs provenant de lots différents.
- Eviter toute contamination microbienne des réactifs et de l'eau. Respecter les temps d'incubations.

6. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

6.1. Pré-analyse

Le dosage s'effectue directement sur sérum ou sur plasma EDTA. Pour un dosage dans les 4 heures, les échantillons doivent être conservés à température ambiante (18-25°C). Pour un dosage jusqu'à 48 heures, les échantillons doivent être conservés à 2-8°C dès le prélèvement. Au-delà de 48 heures, ils doivent être divisés en aliquots qui seront conservés congelés (-20°C) pour une durée allant jusqu'à 10 mois.

Dilutions : Dans le cas de suspicion de taux élevés de CGA, les dilutions s'effectuent avec le tampon diluant fourni dans la trousse. Il est recommandé d'effectuer les dilutions dans des tubes en plastique jetables.

6.2. Pré-dilution des échantillons, des contrôles et des calibrateurs (1/51)

- **Tous les échantillons ainsi que les contrôles et les calibrateurs du kit doivent être pré-dilués 51 fois** dans le diluant

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

 0 fourni dans le kit avant dosage. Mélanger délicatement à l'aide d'un Vortex.

7. PROCÉDURE DU TEST

7.1. Matériel requis

- Pipettes de précision ou tout équipement similaire avec des embouts jetables pour la distribution de 20, 50, 100, 200 et 1 000 µL. L'étalonnage de ces éléments doit être régulièrement contrôlé.
- Eau distillée.
- Tubes en plastique jetables.
- Mélangeur Vortex.
- Laveur de microplaque (en option).
- Agitateur de microplaque.
- Lecteur de microplaque, pouvant mesurer l'absorbance à 450 nm. En option, le lecteur peut être équipé d'un filtre capable de lire l'absorbance à une longueur d'onde comprise entre 610 et 650 nm (longueur de 620 nm recommandée). Cette deuxième lecture permet de corriger les imperfections de la microplaque.

7.2. Protocole

- Tous les réactifs doivent être portés à température ambiante (entre 18 °C et 25 °C) au moins 30 minutes avant leur utilisation. Les réactifs sont collectés et répartis dans les puits à température ambiante (entre 18 °C et 25 °C).
- Chaque calibrateur, contrôle ou échantillon doit être testé deux fois.
- Reconstituer les flacons des calibrateurs et des contrôles. Veiller à vérifier que tout le lyophilisat soit dissous et utiliser le réactif dans l'heure suivant la reconstitution.

7.2.1. Préparation de la solution de lavage | | |----------| | TWEEN 20 | |----------|

- Pour obtenir des résultats fiables et reproductibles, il est conseillé d'exécuter les étapes de lavage en respectant les instructions : le volume résiduel de solution de lavage doit être le plus faible possible. Il est conseillé d'utiliser un laveur de microplaque.
- Pour préparer la solution de lavage, diluer 9 mL de Tween 20

TWEEN 20

 dans 3L d'eau distillée. Agiter doucement.

7.2.2. Instructions - Respecter l'ordre d'ajout des réactifs

Voir la dernière page pour la fiche de protocole du laboratoire. Il est nécessaire de lire l'intégralité de la notice avant d'utiliser la fiche de protocole du laboratoire.

1. Préparer et numéroter une quantité suffisante de tubes à essai pour effectuer une pré-dilution des échantillons, des calibrateurs et des contrôles.
2. Déterminer le nombre de barrettes de micropuits nécessaires pour le test. Retirer les barrettes inutilisées du support et les stocker entre 2 °C et 8 °C dans le sachet à fermeture adhésive correctement fermé avec un agent desséchant.
3. **Pré-diluer les calibrateurs, les échantillons et les contrôles dans des tubes en plastique selon un rapport de 1:51.**
 - a. Distribuer 1 mL de diluant

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

 0 dans les tubes plastiques.
 - b. Ajouter 20 µL de chaque calibrateur, contrôle ou échantillon et mélanger délicatement à l'aide d'un mélangeur de type Vortex
4. Distribuer 200 µL de calibrateur

CAL

, d'échantillon ou de contrôle

CONTROL

 préalablement dilué au 1/51 dans le tampon de dilution

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

 0 dans tous les puits.
5. Couvrir avec le film adhésif, **agiter 1h à 700 rpm** à température ambiante (18-25°C).
6. Laver les puits en respectant la procédure suivante :

- a. Aspirer le contenu des puits
 - b. Distribuer 300µL de solution de lavage **TWEEN 20** dans chaque puits, préparée selon les instructions de la section 7.2.1.
 - c. Renouveler cette opération deux fois encore pour un total de 3 cycles de lavage.
 - d. Terminer par une aspiration. Le volume résiduel de solution de lavage doit être le plus faible possible. Il est possible de retourner la plaque et la tapoter doucement sur du papier absorbant pour éliminer tout liquide restant à l'intérieur des puits.
7. Distribuer **200 µL** de conjugué HRP **CONJ** dans tous les puits.
 8. Couvrir avec le film adhésif et **incuber 2h +/- 5'** à température ambiante (**18 - 25°C**) **sous agitation à 700 rpm**.
 9. Laver les puits comme indiqué au point 6 puis,
 10. Distribuer 100 µL de TMB **SUBS** **TMB** dans tous les puits. Couvrir avec le film adhésif. L'incubation à l'obscurité n'est pas nécessaire.
 11. Laisser la réaction colorimétrique se développer **pendant 10 min précises** à température ambiante (18 – 25°C), **sous agitation (700 rpm)**
 12. Arrêter la réaction par addition de **50 µL** de solution d'arrêt **STOP** **SOLN** dans tous les puits.
 - Lire l'absorbance à 450 nm. Faire une seconde lecture (optionnelle) de l'absorbance à une longueur d'onde comprise entre 610 nm et 650 nm.

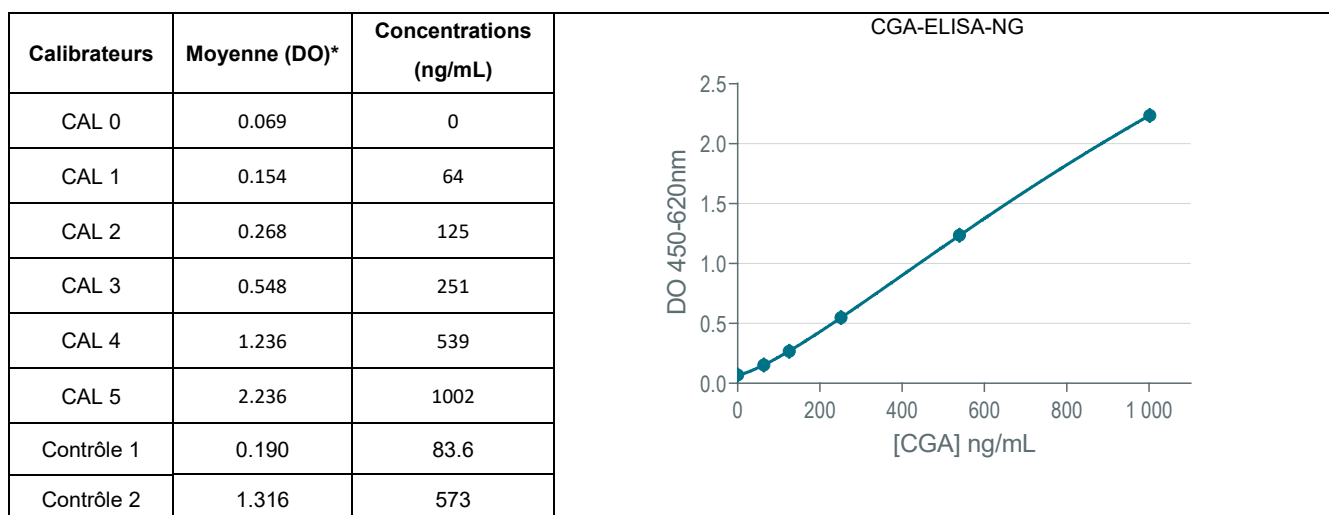
8. CONTRÔLE QUALITÉ

Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) exigent que des échantillons de contrôle qualité soient utilisés dans chaque série de tests afin de contrôler la qualité des résultats obtenus. Tous les échantillons doivent être traités de façon identique. Il est en outre recommandé d'effectuer une analyse des résultats en utilisant les méthodes statistiques appropriées.

9. RÉSULTATS

1. Correction de DO optionnelle* : soustraire la lecture à 620 nm de la lecture à 450 nm.
2. Pour chaque duplicat, calculer l'absorbance moyenne (DO) des calibrateurs, des contrôles et des échantillons.
3. Construire une courbe de calibration en déterminant les valeurs de DO moyenne (corrigée*) à 450 nm des calibrateurs (axe y) en fonction de la concentration (axe x) indiquée sur le flacon.
4. Il est conseillé d'utiliser le modèle mathématique de lissage **4 paramètres logistique pondéré (4-PL pondéré 1/y²)** pour calculer les courbes de calibration. D'autres fonctions de modélisation des données peuvent donner des résultats légèrement différents. Lire les valeurs des échantillons à partir de la courbe. Le rapport de prédilution 1:51 est déjà calculé dans les concentrations de calibrateurs.

Exemple de données de test : à des fins d'illustration uniquement. Ne doit en aucun cas se substituer aux résultats obtenus en laboratoire.



10. LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Les échantillons présentant une turbidité, une hémolyse, une hyperlipémie ou contenant de la fibrine peuvent donner des résultats inexacts.
- Ne pas extrapoler les valeurs d'échantillons au-delà du dernier calibrateur. Diluer les échantillons concernés et relancer le test.
- Ne pas utiliser le kit CGA-ELISA-NG pour doser la CGA circulante chez les patients prenant un traitement à base d'inhibiteur de la pompe à protons ou chez les patients atteints de dysfonction rénale ou de gastrite atrophique. Ces patients présentent des niveaux physiologiquement élevés de CGA circulante sans que cela ne soit lié à la présence d'une tumeur neuroendocrine.
- Ne pas interpréter les résultats obtenus chez des patients sous traitement à base d'analogues de la somatostatine, ces patients peuvent présenter des résultats faussement abaissés.

11. PERFORMANCES ANALYTIQUES

11.1 Imprécision

Echantillons	n	Concentration Moyenne (ng/mL)	Intra-série (CV%)
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

Echantillons	n	Concentration Moyenne (ng/mL)	Inter-séries (CV%)
1	28	51.3	11.5
2	28	187	6.4
3	28	442	6.8
4	20	697	7.0

11.2 Test de recouvrement

Des quantités connues de CGA ont été ajoutées à des sérums humains. Les pourcentages de recouvrement dans les échantillons s'échelonnent entre 90 et 110 %.

11.3 Test de dilution

Des échantillons de concentration élevée ont été dilués. Les pourcentages de récupération obtenus sont compris entre 80% et 120%.

11.4 Spécificité

Aucune interférence n'a été observée lorsque les échantillons sériques ont été surchargés avec l'une des substances suivantes :

- Glucagon (jusqu'à 3000ng/mL)
- Gastrine (jusqu'à 3000ng/mL)
- Chromogranine B (jusqu'à 3000ng/mL)
- NSE (jusqu'à 3000ng/mL)
- Pancréatique polypeptide (jusqu'à 3000ng/mL)

11.5 Plage de mesure

Les échantillons doivent être mesurés dans la plage comprise entre la limite de quantification et la plus haute concentration de la gamme de calibration soit 30.6 et 1000 ng/mL.

11.6. Limite de detection

La limite de détection (LOD ou sensibilité analytique) du kit CGA-ELISA-NG est définie comme la plus basse concentration détectable qui soit discriminable de 0 avec une probabilité à 95 %, calculée en ajoutant 2 écarts-types à la moyenne de 30 analyses répétées du calibrateur 0 (CAL0). Elle a été mesurée à 16.9 ng/mL.

La sensibilité fonctionnelle est définie comme étant la concentration mesurée par profil d'imprécision à un CV égal à 20 %. Elle est estimée à 30.6 ng/mL.

11.7. Effet crochet

Il n'y a pas d'effet crochet jusqu'à 1.000.000 ng/mL.

11.8. Interférences

- En suivant le protocole de test décrit dans les instructions d'utilisation, aucune interférence de la biotine n'a été mesurée pour des taux allant de 0 à 600 ng/mL.
REMARQUE : Les résultats ont montré qu'une concentration de biotine à 1200ng/ml provoquait une légère interférence (-14 % de biais maximum) avec le kit CGA-ELISA-NG.
- Aucune interférence à la bilirubine et à l'hémoglobine mesurées jusqu'à des concentrations respectives égales à 0.15mg/mL, 2mg/mL, n'a été observée.
- Aucune interférence n'a été observée lorsque des échantillons sériques ont été testés avec des Triglycérides d'échantillons humains hyperlipidémiques (743,4 mg/dL TG total)

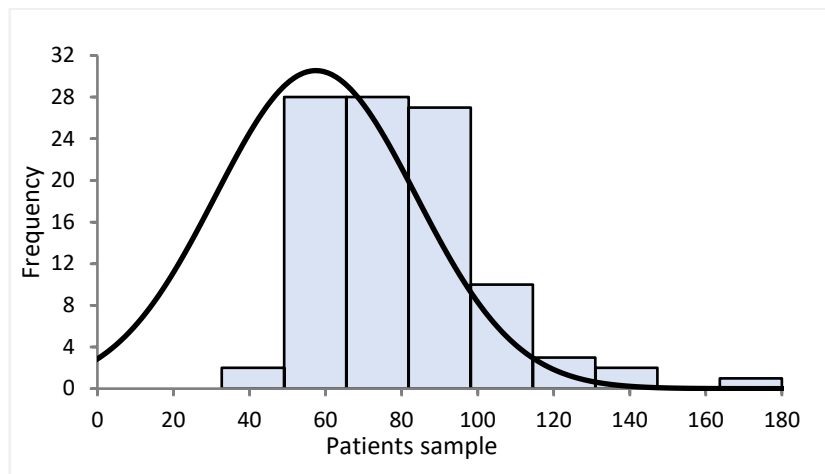
MISE EN GARDE : le dosage immunologique est protégé contre les interférences potentielles avec les anticorps hétérophiles tels que les HAMA (anticorps humains anti-murins) et les facteurs rhumatoïdes (FR) par l'ajout d'une protection de type immunoglobulines de souris non spécifiques. Néanmoins, nous ne pouvons garantir l'absence totale de résultats « faux positifs ou négatifs » du fait de la présence d'anticorps hétérophiles ou de facteurs rhumatoïdes dans les échantillons des patients.

12. VALEURS NORMALES ATTENDUES

Il est conseillé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales en fonction du type de prélèvement couramment utilisé. La chromogranine A est une protéine fixant le calcium et ses taux circulants sont influencés par la concentration de Ca⁺⁺. Les valeurs normales retrouvées sont différentes selon que l'on dose des sérums prélevés sur tube sec ou des plasmas EDTA.

Les valeurs ci-dessous, sont données à titre indicatif et ont été obtenues sur échantillons de sérum avec une population de 101 sujets présumés normaux.

Pour la distribution des valeurs normales présentée ci-dessous, **le 95e percentile se situe à 101ng/mL.**

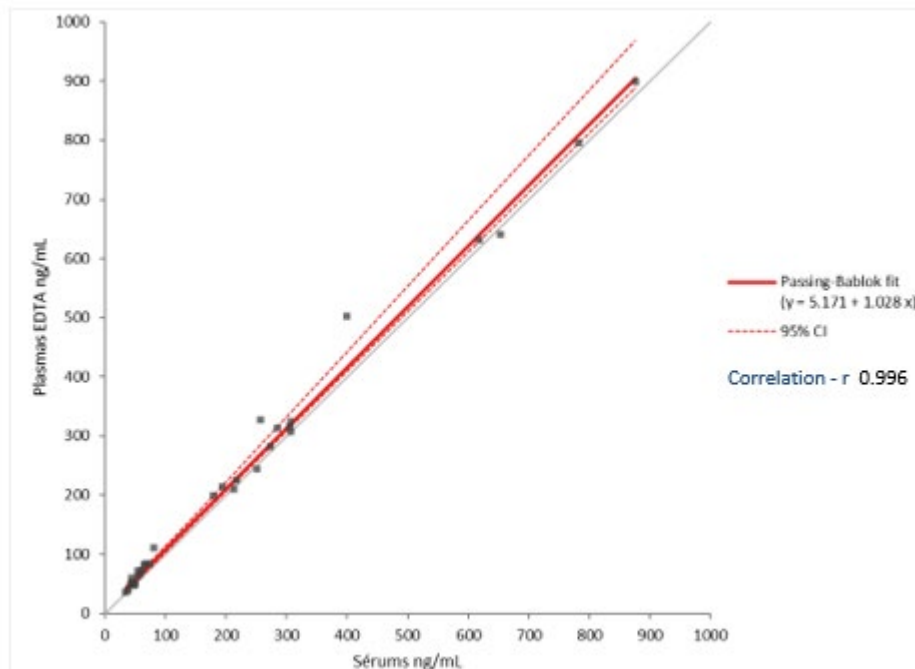


- Valeurs normales pour des échantillons de plasma EDTA :

Les valeurs sont déterminées en fonction de la corrélation sérum plasma ci-dessous.

L'équation de la corrélation est la suivante : [échantillon plasma] = 1.028 x [échantillon sérum] + 5.171

Cette équation doit être appliquées aux valeurs normales trouvées sur échantillons sériques, pour en extrapoler les valeurs sur plasma EDTA.



13. BIBLIOGRAPHIE

- 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. 2017 Jul;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.

CGA-ELISA-NG



FICHE DE PROTOCOLE DE LABORATOIRE

Ne pas utiliser cette fiche sans avoir lu l'intégralité de la notice.

➔ **Prédiluer** les calibrateurs, les échantillons et les contrôles dans des tubes selon un rapport **1:51**.

1. DISTRIBUER 1mL de diluant dans les tubes

DIL CAL 0

2. AJOUTER 20µL de chaque calibrateur, contrôle ou échantillon et mélanger délicatement à l'aide d'un mélangeur de type vortex.

CAL CONTROL

3. DISTRIBUER LES ECHANTILLONS DANS LA MICROPLAQUE

CAL CONTROL

↓ Distribuer 200µL de **calibrateur, d'échantillon ou de contrôle préalablement dilué au 1:51** dans le tampon de dilution dans tous les puits (distribution en dupliquat).

4. AGITATION

↓ Couvrir avec le film adhésif, **agiter 1H à 700 rpm** à température ambiante (18- 25°C).

5. LAVER LES PUIITS (voir § 7.2.1)

TWEEN 20

Préparer la solution de lavage en diluant 9mL de Tween 20 dans 3L d'eau distillée.

Aspirer le contenu des puits.

Distribuer 300µL de solution de lavage dans chaque puits.

Renouveler cette opération deux fois encore pour un total de trois cycles de lavage.

Terminer par une aspiration. Le volume résiduel de solution de lavage doit être le plus faible possible. Il est possible de retourner la plaque et la tapoter doucement sur du papier absorbant pour éliminer tout liquide restant à l'intérieur des puits.

6. DISTRIBUER LE CONJUGUE

CONJ

↓ Distribuer 200µL de conjugué HRP dans tous les puits.

7. INCUBER

Couvrir avec le film adhésif et incuber **2h +/-5'** à température ambiante (18-25°C) **sous agitation à 700 rpm**.

8. LAVER LES PUIITS (voir § 7.2.1)

TWEEN 20

Préparer la solution de lavage en diluant 9mL de Tween 20 dans 3L d'eau distillée.

Aspirer le contenu des puits.

Distribuer 300µL de solution de lavage dans chaque puits.

Renouveler cette opération deux fois encore pour un total de trois cycles de lavage.

Terminer par une aspiration. Le volume résiduel de solution de lavage doit être le plus faible possible. Il est possible de retourner la plaque et la tapoter doucement sur du papier absorbant pour éliminer tout liquide restant à l'intérieur des puits.

9. DISTRIBUER LE SUBSTRAT

SUBS TMB

↓ Distribuer 100µL de TMB dans tous les puits. Couvrir avec le film adhésif. L'incubation à l'obscurité n'est pas nécessaire.

Laisser la réaction colorimétrique se développer **pendant 10 min précises** à température ambiante (18-25°C), **sous agitation à 700 rpm**.

10. DISTRIBUER LA SOLUTION D'ARRÊT

STOP SOLN

↓ Arrêter la réaction par addition de 50µL de solution d'arrêt dans tous les puits.

11. LECTURE

🏠 Lire l'absorbance à **450nm**. Faire une seconde lecture (optionnelle) de l'absorbance à une longueur d'onde de 620nm (610 à 650nm). Utiliser le modèle de lissage à **4 paramètres logistique pondéré** pour le traitement des données.

1:51 pre-dilution

+ 200 µL



↻ 700 rpm 1h



3 x 300 µL



+ 200 µL



↻ 700 rpm

2h +/-5'



3 x 300 µL



+ 100 µL



↻ 700 rpm 10 min



+ 50 µL



450 nm





FRA

Modifications par rapport à la version précédente :
Ajout du portugais

ENG

Changes from the previous version:
Addition of Portuguese

DEU

Änderungen gegenüber der Vorgängerversion:
Hinzufügen von Portugiesisch

ITA

Modifiche rispetto alla versione precedente:
Aggiunta del portoghese

SPA

Cambios desde la versión anterior:
Adición de portugués

HUN








Változások az előző verzióhoz képest:
Portugál hozzáadása

CES

Změny od předchozí verze:
Přidání portugalštiny

POR

Alterações em relação à versão anterior:
Adição de português

	FRA	ENG	DEU	ITA	SPA	HUN	CES	POR
	Explication des symboles	Explanation of symbols	Erläuterung der Symbole	Spiegazione dei simboli	Significado de los símbolos	Jelmagyarázat	Vysvětlení symbolů	Significadodos símbolo
	Limite de température	Temperature limitation	Temperaturbegrenzung	Limiti di temperatura	Limitación de temperatura	Tárolási hőmérséklethatár	Mezní teplota skladování	Limite da temperatura de armazenagem
LOT	Code du lot	Batch code	Chargencode	codice lotto	Código de lote	Gyártási szám	Č. šarže	Lote
	Utiliser jusqu'au	Use by	Verwendbar bis	utilizzare entro	Fecha de caducidad	Felhasználható az alábbi dátumig :	Použitelné do	Utilizado por
	Consulter la notice d'utilisation	Consult instructions for use	Das Handbuch zu Rate ziehen	Consultare le istruzioni per l'uso	Consúltense las instrucciones de uso	Olvassa el a használati utasítást	Přečtěte si návod k použití	Consulte o manual de operações
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro	In vitro medical device	In-VitroDiagnostis che Anwendung	Dispositivo Diagnostico In Vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro	In vitro diagnosztika	Diagnostika in vitro	Dispositivo de diagnostico In Vitro
	Fabricant	Manufacturer	Hersteller	Fabbricante	Fabricante	Gyártó	Vyrobil	Fabricado por
REF	Référence du catalogue	Catalogue number	Katalog Nr.	N. catalogo	Número de catálogo	Referenciakészítmény	Reference	Número do catalogo
	Suffisant pour	Sufficient for	Ausreichend für	Sufficiente per	Válido para	A kémcsövek száma	Počet zkumavek	Suficiente para
	Conserver à l'abri de la lumière du soleil	Keep away from sunlight	Vor Sonnenlicht schützen	Conservare al riparo dalla luce solare	Manténgase fuera de la luz del sol	Napfénytől védve tárolandó	Chraňte před slunečním světlem	Manter afastado da luz solar
	Risques biologiques	Biological Risks	Biogefährdung	Rischio biologico	Riesgos biológicos	Biológiai veszély	Biologické riziko	Riscos Biológicos
CONJ	Conjugué	Conjugate	Komplex	Coniugato	Conjugado	Kétfázisú elegy	Konjugát	Conjugado
CAL	Calibrateur	Calibrator	Kalibrator	Calibratore	Calibrador	Kalibrátor	Kalibrátor	Calibrador
CONTROL	Contrôle	Control	Kontrolle	Controllo	Control	Kontroll	Kontrola	Controle
TWEEN 20	Solution concentrée	Concentrated solution	Konzentrierte Lösung	Soluzione concentrata	Solución concentrada	Koncentrált oldat	Koncentrovaný roztok	Solução concentrada
MICROPLATE	Microplaque	Microplate	Mikrotiterplatte	Micropiastra	Microplaca	mikrolemez	Mikrotitrační destička	Microplaca
DIL CAL	Diluant	Diluent	Verdünnungsmittel	Diluyente	Diluyente	Hígítószer	ředidlo	Diluyente
SUBS TMB	Substrat	Substrate	Substrat	Sustrato	Substrato	Szubsztrátum	Substrát	Substrato
STOP SOLN	Solution d'arrêt	Stop solution	Stopplösung	Soluzione d'arresto	Solución de parada	Semlegesítő oldat	Zastavovací roztok	Solução de paragem