

Istruzioni per l'uso - ITA



Riferimento del documento: 4 Febbraio 2023

1. NOME E USO PREVISTO

Il prodotto **CGA-ELISA-NG** è un kit per la rilevazione enzimatica quantitativa della cromogranina A umana (CGA) su siero o su plasma EDTA negli adulti.

Il kit **CGA-ELISA-NG** è destinato a essere utilizzato come ausilio alla diagnosi nella determinazione della presenza e della progressione di neoplasie neuroendocrine (NNE) di tipo GEP (Gastro-Entero-Pancreatico), negli adulti.

Il kit è destinato all'uso professionale e all'uso manuale.

2. INTRODUZIONE

La CGA è una proteina idrofila e acida composta da 439 aminoacidi (49 kD) ed è presente nei granuli cromaffini delle cellule neuroendocrine. Appartiene alla famiglia delle granine. La CGA agisce come proormone. La proteolisi svolge un ruolo fondamentale nella sua fisiologia. Questa degradazione rilascia peptidi biologicamente attivi (vasostatina, cromostatina, pancreastatina, parastatina), che hanno diverse funzioni paracrine e autocrine. Tale proteolisi è tessuto-specifica, quindi la frammentazione della proteina sarà diversa in base alla sua localizzazione. Essa si sviluppa principalmente nella cellula, all'interno dei granuli cromaffini. In immunisto chimica, la presenza di CGA nelle cellule tumorali è suggestiva di tumore di origine neuroendocrina. La CGA circolante è presente in soggetti sani e i valori riscontrati sono indipendenti dall'età e dal sesso. La rilevanza della determinazione della CGA nei campioni di siero è stata dimostrata per i tumori endocrini, con elevazioni particolarmente significative nei tumori endocrini gastro-entero-epatici. Gli studi hanno dimostrato che i livelli circolanti di CGA erano associati a una differenziazione neuroendocrina e collegati alla massa tumorale, senza per questo sostituirsi a secrezioni più specifiche.

3. PRINCIPIO

Il kit CHROMOGRANIN A è un immunodosaggio di tipo ELISA. Un primo anticorpo monoclonale, immobilizzato sulla micropiastra, cattura le proteine CGA contenute nei calibratori e nei campioni. Dopo i lavaggi, le proteine fissate vengono riconosciute da un secondo anticorpo monoclonale coniugato all'HRP (Horse-Radish-Peroxidase, Perossidasi di Rafano). Dopo una seconda incubazione, i reagenti non fissati vengono eliminati mediante lavaggio. Viene quindi avviata la reazione colorimetrica con l'aggiunta di un substrato dell'HRP, il TMB (3, 3', 5, 5' Tetrametilbenzidina). Dopo l'arresto della reazione, la densità ottica (DO) di ciascun pozzetto viene letta a 450 nm. Le DO misurate sono proporzionali alla concentrazione di proteina CGA contenuta nei calibratori e nei campioni.

4. REAGENTI

Ogni kit contiene i reagenti sufficienti per 96 test (compresa la generazione della curva di calibrazione). La data di scadenza è indicata sull'etichetta esterna.

REAGENTI	SIMBOLI	QUANTITÀ	CONSERVAZIONE
----------	---------	----------	---------------

REAGENTI	SIMBOLI	QUANTITÀ	CONSERVAZIONE
MICROPIASTRA: Pronto all'uso. Anticorpo monoclonale di topo anti-CGA fissato al fondo del pozzetto, Albumina bovina.	MICROPLATE	1 piastra di 96 pozzetti	Prima dell'apertura: 2-8 °C fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura: le strisce non utilizzate possono essere conservate per 6 settimane nel sacchetto di plastica fornito, con un essiccante, adeguatamente sigillato, entro i limiti della data di scadenza.
CONIUGATO: Pronto all'uso Anticorpo monoclonale di topo anti-CGA legato all'HRP, immunoglobuline di topi non immunizzati, stabilizzanti e conservante.	CONJ	1 fialone 22mL	Prima dell'apertura: 2-8 °C fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura: il coniugato può essere conservato a 2-8°C per un periodo di 6 settimane, entro i limiti della data di scadenza.
CALIBRATORI: Liofilizzati. CGA umana ricombinante, siero umano, EDTA, conservante. 75 – 140 – 300 – 600 – 1000 ng/mL * Ricostituire con 0,25 mL di acqua distillata.	CAL	5 fialoni	Prima dell'apertura: 2-8 °C fino alla data di scadenza. Dopo la ricostituzione: non conservare per più di un'ora a temperatura ambiente, aliquotare e congelare a -20 °C per un periodo di 6 settimane, entro i limiti della data di scadenza.
CONTROLLI: Liofilizzati. CGA umana ricombinante, siero umano, EDTA, conservante. 90 – 720 ng/mL ** Ricostituire con 0,25 mL di acqua distillata.	CONTROL	2 fialoni	Prima dell'apertura: 2-8 °C fino alla data di scadenza. Dopo la ricostituzione: non conservare per più di un'ora a temperatura ambiente, aliquotare e congelare a -20 °C per un periodo di 6 settimane, entro i limiti della data di scadenza.
DIL/CAL0: Pronto all'uso. Questo reagente è utilizzato come tampone di incubazione, diluente e calibratore 0. Tampone, siero di manzo, sodio azide, EDTA.	DIL CAL 0	1 fialone 80 mL	Prima dell'apertura: 2-8 °C fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura: il diluente/CAL0 può essere conservato a 2-8°C per un periodo di 6 settimane, entro i limiti della data di scadenza.
TWEEN 20: Soluzione di lavaggio concentrata Diluire 9 mL di Tween 20 in 3 L di acqua distillata. Agitare delicatamente.	TWEEN 20	1 fialone 10 mL	Prima dell'apertura: 2-8 °C fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura: il Tween 20 può essere conservato a 2-8°C per un periodo di 6 settimane, entro limiti della data di scadenza.
SUBSTRATO: Pronto all'uso 3, 3', 5, 5' Tetrametilbenzidina: TMB	SUBS TMB	1 fialone 15 mL	Prima dell'apertura: 2-8 °C fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura: il TMB può essere conservato a 2-8°C per un periodo di 6 settimane, entro i limiti della data di scadenza.
SOLUZIONE DI ARRESTO: Pronto all'uso Acido solforico 0,5 M.	STOP SOLN	1 fialone 22 mL	Prima dell'apertura: 2-8 °C fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura: la soluzione di arresto può essere conservata a 2-8°C per un periodo di 6 settimane, entro i limiti della data di scadenza.
FILM ADESIVO PER MICROPIASTRA		3	
SACCHETTO DI PLASTICA		1	

(*) I valori sopra indicati sono valori target, quelli reali sono riportati sulle etichette dei fialoni.

(**) I valori reali del limite di accettazione sono riportati sulle etichette dei fialoni.

5. PRECAUZIONI PER L'USO

5.1. Misure di sicurezza

- Le materie prime di origine umana contenute nei reagenti di questo kit sono state testate con kit approvati e sono risultate negative agli anticorpi anti-HIV 1, anti-HIV 2, anti-HCV e all'antigene HBs. Tuttavia, poiché è impossibile garantire in modo

assoluto che tali prodotti non possano trasmettere l'epatite, il virus HIV o qualsiasi altra infezione virale, tutte le materie prime di origine umana, compresi i campioni da dosare, devono essere considerate come potenzialmente infetti.

- Non pipettare con la bocca.
- Non fumare, bere, mangiare nei locali in cui si manipolano i campioni o i reagenti del kit. Indossare guanti monouso durante la manipolazione dei reagenti o dei campioni del kit e, al termine, lavarsi accuratamente le mani. Evitare gli schizzi.
- Decontaminare e smaltire i campioni e tutto il materiale potenzialmente contaminato come se contenessero agenti infetti. Il miglior metodo di decontaminazione è la sterilizzazione in autoclave per almeno un'ora a 121,5 °C.
- La sodio azide può reagire con le tubazioni in piombo e rame formando azoturi metallici fortemente esplosivi.
- Quando si smaltiscono i rifiuti, diluirli abbondantemente per evitare la formazione di questi prodotti.



CAL CONTROL CONJ

AVVERTENZA

H317: Può provocare una reazione allergica cutanea

STOP SOLN

Non classificato come pericoloso ma soluzione con PH acido

DIL CAL 0

Contiene sodio azide (<0,1%)

5.2. Precauzioni per la manipolazione

- Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza.
- Non utilizzare insieme reagenti di lotti diversi.
- Evitare qualsiasi contaminazione microbica dei reagenti e dell'acqua. Rispettare i tempi di incubazione.

6. PRELIEVO DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

6.1 Fase preanalitica

Il dosaggio viene effettuato direttamente su siero o plasma EDTA. Se il dosaggio viene effettuato entro le 4 ore, i campioni devono essere conservati a temperatura ambiente (18-25 °C). Se il dosaggio viene effettuato entro le 48 ore, dopo il prelievo i campioni devono essere conservati a 2-8 °C. Se il dosaggio viene effettuato oltre le 48 ore, i campioni devono essere divisi in parti aliquote che devono essere conservate congelate (-20 °C) fino a 10 mesi.

Diluzione: Se si sospettano livelli elevati di CGA, la diluizione deve essere effettuata utilizzando il tampone diluente fornito con il kit. Si raccomanda di effettuare le diluizioni in provette in plastica monouso.

6.2 Prediluizione di campioni, controlli e calibratori (1/51)

- **Tutti i campioni, i controlli e i calibratori devono essere prediluiti 51 volte** nel diluente **DIL CAL 0** fornito nel kit prima di essere testati. Mescolare delicatamente la miscela utilizzando un agitatore tipo Vortex.

7. PROCEDURA DI DOSAGGIO

7.1 Materiale necessario

- Micropipette di precisione o materiale simile con puntale monouso che consenta l'erogazione di 20, 50, 100, 200 e 1000 µL. La loro calibrazione deve essere verificata regolarmente.
- Acqua distillata.
- Provette in plastica monouso.

- Agitatore tipo Vortex.
- Lavatore per micropietra (facoltativo).
- Agitatore per micropiastre.
- Lettore di micropiastre, in grado di misurare l'assorbanza a 450 nm. Facoltativamente, il lettore può essere dotato di un filtro in grado di leggere l'assorbanza a una lunghezza d'onda compresa tra 610 nm e 650 nm (si raccomanda 620 nm). Questa seconda lettura permette di correggere le imperfezioni della micropietra.

7.2 Protocollo

- Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (18-25 °C) almeno 30 minuti prima del loro utilizzo. I reagenti vengono pipettati e dispensati nei pozzetti a temperatura ambiente (18-25 °C).
- Ogni calibratore, controllo o campione deve essere testato in duplicato.
- Ricostituire i flaconi dei calibratori e dei controlli. Controllare attentamente che tutto il prodotto liofilizzato sia dissolto e utilizzarlo entro un'ora dalla ricostituzione.

7.2.1 Preparazione della soluzione di lavaggio **TWEEN 20**

- Per ottenere risultati affidabili e riproducibili, si raccomanda di eseguire le fasi di lavaggio come indicato; il volume residuo di soluzione di lavaggio deve essere il più basso possibile. Si raccomanda l'uso di un lavatore per micropiastre.
 - Per preparare la soluzione di lavaggio, diluire 9 mL di Tween 20 **TWEEN 20** in 3 L di acqua distillata. Mescolare lentamente.

7.2.2 Istruzioni - Rispettare l'ordine di aggiunta dei reagenti

Verdere l'ultima pagina per la scheda del protocollo di laboratorio. Prima di utilizzare la scheda del protocollo di laboratorio è necessario leggere completamente il foglietto illustrativo nei dettagli.

1. Preparare e identificare un numero sufficiente di provette per eseguire una prediluizione di campioni, calibratori e controlli
2. Determinare il numero di strisce per microtitolazione necessarie per il dosaggio. Rimuovere le strisce inutilizzate dal supporto del telaio e conservarle a 2-8 °C nel sacchetto adesivo, adeguatamente sigillato, con un essiccante.
3. **Prediluire i calibratori, i campioni e i controlli in provette di plastica secondo un rapporto 1:51**
 - a. Dispensare 1 mL di diluente **DIL CAL** 0 nelle provette di plastica
 - b. Aggiungere 20 µL di ciascun calibratore, controllo o campione e mescolare delicatamente con un agitatore tipo Vortex
4. Dispensare 200 µL di calibratori prediluiti **CAL**, campioni o controlli **CONTROL** in un rapporto 1/51 nel DIL/CAL0 **DIL CAL** 0 in ogni pozzetto.
5. Coprire con il film adesivo, agitare per **1 ora a 700 rpm** a temperatura ambiente (**18-25 °C**).
6. Lavare i pozzetti nel modo seguente:
 - a. Rimuovere il contenuto dei pozzetti
 - b. Dispensare 300 µL di soluzione di lavaggio **TWEEN 20** preparata come descritto nel capitolo 7.2.1
 - c. Ripetere i punti a. e b. altre 2 volte per un totale di 3 cicli di lavaggio.
 - d. Terminare con un'aspirazione. Il volume residuo di soluzione di lavaggio deve essere il più ridotto possibile. È possibile picchiare delicatamente la piastra capovolta per rimuovere il liquido residuo.
7. Dispensare **200 µL** di coniugato HRP **CONJ** in tutti i pozzetti.
8. Coprire con il film adesivo e **incubare per 2 ore +/- 5'** a temperatura ambiente (18-25 °C) agitando a **700 rpm**.
9. Lavare i pozzetti come sopraindicato, quindi:
10. Dispensare 100 µL di TMB **SUBS TMB** in tutti i pozzetti. Coprire con il film adesivo. Non è necessaria l'incubazione al buio.
11. Lasciare che la reazione colorimetrica si sviluppi per **10 minuti esatti** a temperatura ambiente (18-25 °C), **agitando a 700 rpm**.
12. Arrestare la reazione aggiungendo 50 µL di soluzione di arresto **STOP SOLN** in tutti i pozzetti.

- Leggere l'assorbanza a 450 nm. Eseguire una seconda lettura (opzionale) dell'assorbanza a una lunghezza d'onda compresa tra 610 nm e 650 nm.

8. CONTROLLO QUALITÀ

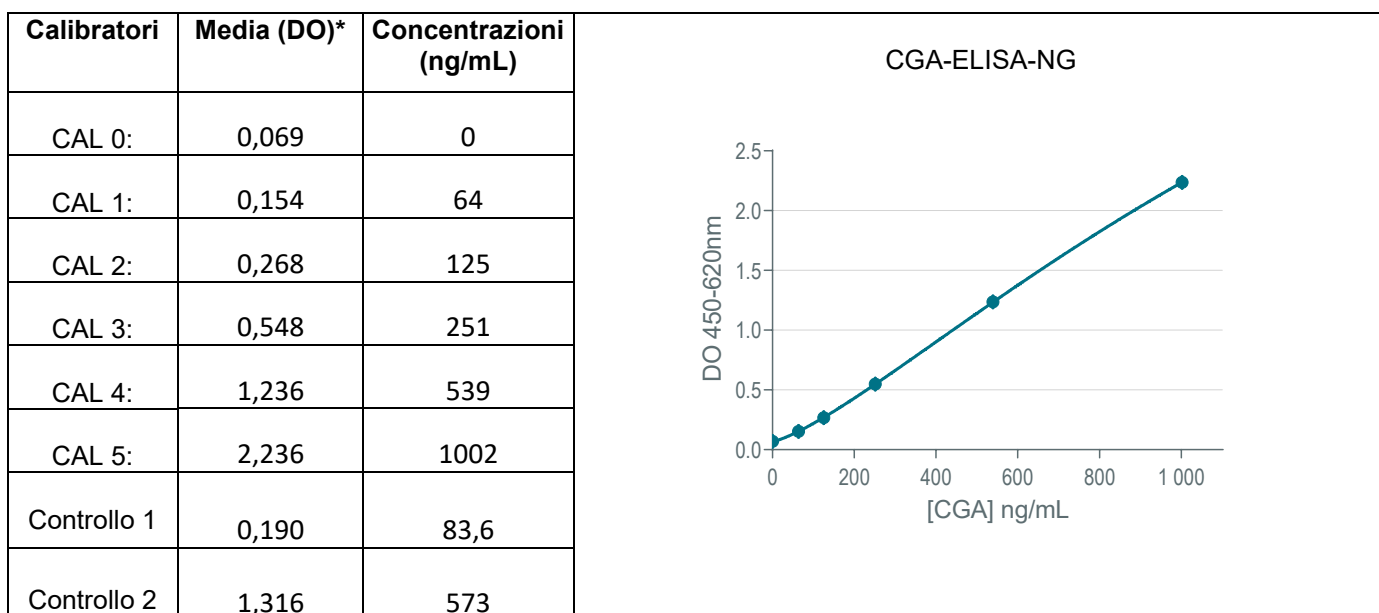
Le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) richiedono l'impiego di campioni di controllo per ciascuna serie di dosaggi al fine di accertare la qualità dei risultati ottenuti. Tutti i campioni devono essere trattati allo stesso modo e si raccomanda di analizzare i risultati utilizzando metodi statistici idonei.

9. RISULTATI

1. Correzione opzionale DO*: sottrazione letture a da 620 nm dalle letture a 450 nm.
2. Per ogni duplicato, calcolare l'assorbanza media (DO) di calibratori, controlli e campioni.
3. Costruire una curva di taratura calibrazione tracciando i valori DO medi (corretti*) a 450 nm dei calibratori (asse y) in funzione della loro concentrazione (asse x) indicata sul flacone.
4. Per le curve di taratura si raccomanda il modello matematico di fitting con logistica 4PL e peso $1/y^2$. Altre funzioni di riduzione dei dati possono dare risultati leggermente diversi.

Leggere la concentrazione dei campioni dalla curva. Il rapporto di prediluizione di 1:51 è già calcolato nelle concentrazioni dei calibratori.

Esempio di dati di dosaggio: solo a titolo illustrativo; non deve in nessun caso essere sostituito ai risultati ottenuti in laboratorio.



10. LIMITI DELLA PROCEDURA

- I campioni che presentano torbidità, emolisi, iperlipemia o che contengono fibrina possono dare risultati imprecisi.
- Non estrapolare i valori dei campioni oltre l'ultimo standard. Diluire i campioni ad alta concentrazione e ridosarli.
- Non usare il kit CGA-ELISA-NG per la determinazione della CGA circolante in pazienti con trattamenti in corso a base di farmaci inibitori della pompa protonica o in pazienti con funzione renale ridotta o con gastrite atrofica. Questi pazienti hanno livelli fisiologicamente elevati di CGA circolante non collegati alla presenza di un tumore neuroendocrino.
- Non interpretare i risultati in pazienti in terapia con analoghi della somatostatina; questi pazienti possono presentare risultati falsamente bassi.

11. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL DOSAGGIO

11.1 Imprecisione

Campioni	n	Concentrazione Media (ng/mL)	Intra-serie (CV%)

Campioni	n	Concentrazione Media (ng/mL)	Inter-serie (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

1	28	51,3	11,5
2	28	187	6,4
3	28	442	6,8
4	20	697	7,0

11.2 Test di recupero

Quantità note di CGA sono state aggiunte a sieri umani. Le percentuali di recupero nei campioni variavano tra il 90% e il 110%.

11.3 Test di diluizione

I campioni ad elevata concentrazione sono stati diluiti. Le percentuali di recupero ottenute erano comprese tra l'80% e il 120%.

11.4 Specificità

Non è stata osservata alcuna interferenza quando i campioni di siero sono stati testati con una delle seguenti sostanze:

- Glugacone (fino a 3000 ng/mL)
- Gastrina (fino a 3000 ng/mL)
- Cromogranina B (fino a 3000 ng/mL)
- NSE (fino a 3000 ng/mL)
- Polipeptide pancreatico (fino a 3000 ng/mL)

11.5 Campo di misura

I campioni devono essere misurati nel campo compreso tra il limite di rilevamento e la massima concentrazione dell'intervallo di calibrazione, ovvero tra 30,6 e 1000 ng/mL.

11.6 Limite di rilevamento

Il limite di rilevamento (LOD o sensibilità analitica) del kit CGA-ELISA-NG è definito come la minima concentrazione rilevabile diversa da zero con una probabilità del 95% calcolata aggiungendo 2 deviazioni standard al valore medio di 30 analisi replicate del calibratore zero (CAL0). È stata misurata a 16,9 ng/mL.

La sensibilità funzionale è definita come la concentrazione misurata per profilo di imprecisione dato un CV pari al 20%. Viene stimata a 30,6 ng/mL.

11.7. Effetto gancio

Assenza di effetto gancio fino a 1.000.000 ng/mL.

11.8. Interferenza

- Quando si segue il protocollo di dosaggio fornito nelle istruzioni per l'uso, non viene misurata alcuna interferenza con la biotina per concentrazioni comprese tra 0 e 600 ng/mL.
- NOTA: I risultati hanno mostrato che una concentrazione di biotina a 1200 ng/mL ha causato una leggera interferenza (-14% bias massimo) con il kit CGA-ELISA-NG.
- Non è stata osservata alcuna interferenza con **la bilirubina e l'emoglobina** misurate fino alle rispettive concentrazioni di 0,15 mg/mL e 2 mg/mL.
- Nessuna interferenza è stata osservata quando i campioni di siero sono stati integrati con trigliceridi da campione umano iperlipidemico e testati (743,4 mg/dL di TG totali).

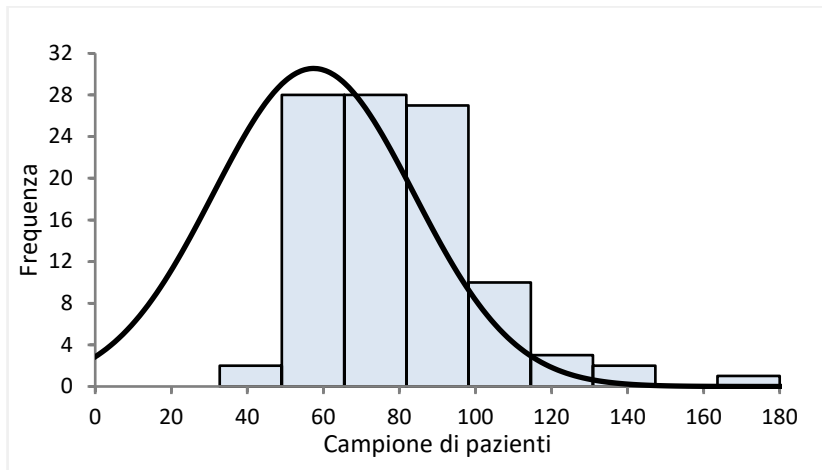
ATTENZIONE: L'immunodosaggio è protetto contro potenziali interferenze dovute ad **anticorpi eterofili** come HAMA e fattori reumatoidi (RF) grazie all'aggiunta di una sostanza protettiva (immunoglobuline di topo non specifiche). Tuttavia, non è possibile escludere che non ci sarà mai un falso risultato positivo o negativo dovuto alla presenza di anticorpi eterofili e fattori reumatoidi nei campioni dei pazienti.

12. VALORI NORMALI ATTESI

Si raccomanda che ogni laboratorio determini il proprio intervallo di valori normali a seconda del tipo di campione comunemente utilizzato. La cromogranina A è una proteina legata al calcio e i suoi livelli circolanti sono influenzati dalla concentrazione di Ca^{++} . I valori umani normali riscontrati possono differire a seconda che vengano analizzati sieri raccolti su provette per la raccolta di sangue secco o plasmi EDTA.

I valori presentati di seguito sono forniti solo a titolo indicativo e sono stati ottenuti su campioni di siero con una popolazione di 101 soggetti presumibilmente sani.

Per la distribuzione dei valori normali presentati di seguito, il 95° percentile si trova a 101 ng/mL.



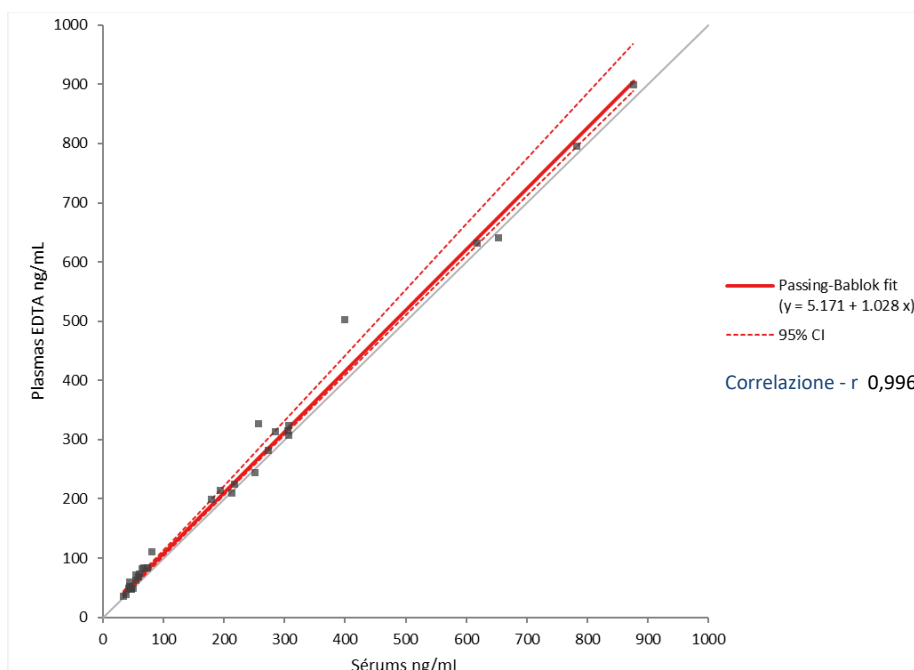
Valori normali su campioni di plasma EDTA:

La correlazione siero/plasma presentata qui di seguito deve essere utilizzata per determinare la concentrazione plasmatica di CGA.

L'equazione della correlazione è la seguente:

$$[\text{Campione di plasma}] = 1,028 \times [\text{Campione di siero}] + 5,171$$

Per estrapolare i valori sul plasma EDTA, questa equazione deve essere applicata ai valori normali trovati sui campioni di siero,



13. BIBLIOGRAFIA

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.



SCHEDA PROTOCOLLO DI LABORATORIO

Non usare questa scheda senza aver letto tutto il foglietto illustrativo.

➔ **Prediluire i calibratori, i campioni e i controlli in provette di plastica a 1:51.**

Prediluizione 1:51

1. DISPENSARE 1 mL di diluente nelle provette di plastica DIL CAL 0

2. AGGIUNGERE 20 µL di ogni calibratore, controllo o campione e agitare delicatamente con un agitatore tipo Vortex CAL CONTROL

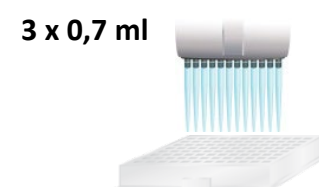
3. DISPENSARE i campioni nella micropiastra CAL CONTROL
 ↓ Dispensare 200 µL di **calibratori, campioni o controlli prediluiti a 1/51** nel DIL/CAL0 in ogni pozzetto (distribuzione in duplicato).



4. AGITAZIONE
 ↓ Coprire con film adesivo e incubare per 2 ore +/- a temperatura ambiente (18-25 °C)



5. LAVARE I POZZETTI (vedere § 7.2.1) TWEEN 20
 Preparare la soluzione di lavaggio diluendo 9 mL di Tween 20 in 3 L di acqua distillata. Rimuovere il contenuto dei pozzetti. Dispensare 300 µL di soluzione di lavaggio preparata in ogni pozzetto. Ripetere i passaggi altre 2 volte per un totale di 3 cicli di lavaggio. Terminare con un'aspirazione. Il volume residuo della soluzione di lavaggio deve essere il più ridotto possibile. È possibile picchiettare delicatamente la piastra capovolta per rimuovere il liquido residuo.



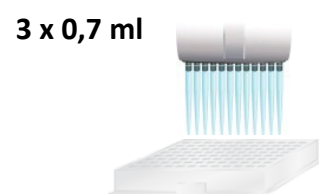
6. DISPENSARE IL CONIUGATO CONJ
 Dispensare 200 µL di coniugato HRP in tutti i pozzetti



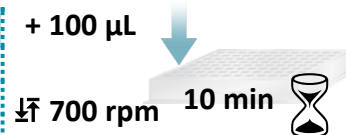
7. INCUBARE
 Coprire con film adesivo e incubare per 2 ore +/- a temperatura ambiente (18-25 °C) **agitando a 700 rpm.**



8. LAVARE I POZZETTI (vedere § 7.2.1) TWEEN 20
 Preparare la soluzione di lavaggio diluendo 9 mL di Tween 20 in 3 L di acqua distillata. Rimuovere il contenuto dei pozzetti. Dispensare 300 µL di soluzione di lavaggio preparata in ogni pozzetto. Ripetere i passaggi altre 2 volte per un totale di 3 cicli di lavaggio. Terminare con un'aspirazione. Il volume residuo della soluzione di lavaggio deve essere il più ridotto possibile. È possibile picchiettare delicatamente la piastra capovolta per rimuovere il liquido residuo.



9. DISPENSARE IL SUBSTRATO SUBS TMB
 ↓ Dispensare 100 µL di TMB in tutti i pozzetti. Coprire con il film adesivo. Non è necessaria l'incubazione al buio. Lasciare sviluppare la reazione colorimetrica per **10 min esatti** a temperatura ambiente (18-25 °C) **agitando 700 rpm**



10. DISPENSARE LA SOLUZIONE DI ARRESTO STOP SOLN
 ↓ Arrestare la reazione aggiungendo 50 µL di soluzione di arresto in tutti i pozzetti.



11. LEGGERE
 🏠 Leggere l'assorbanza a **450 nm**. Eseguire una seconda lettura (opzionale) dell'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 620 nm (tra 610 e 650 nm). Utilizzare un fit **logistico bilanciato a 4 parametri** per l'interpolazione dei dati.





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	Přečtete 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