



























- (6) Alle Reagenzien des Kits sowie die Proben sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Verwenden Sie für Verdünnungs- oder Rekonstitutionszwecke deionisiertes, destilliertes oder ultrareines Wasser. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben vermeiden.
- (7) Die Mikrotiterplatte verfügt über einzeln herausnehmbare und abbrechbare Streifen. Ungenutzte Wells müssen bei 2 °C bis 8 °C mit Trockenmittelbeutel im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden. Die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden um Verwechslungen zu vermeiden.
- (8) Proben sollten in Doppelbestimmung gemessen werden.
- (9) Sobald der Test begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung ausgeführt werden. Es muss dafür gesorgt werden, dass die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Geräte zur vorgesehenen Zeit einsatzbereit sind.
- (10) Die Inkubationszeiten haben Einfluss auf die Ergebnisse. Alle Wells sollten in der gleichen Reihenfolge und zeitlichen Abfolge behandelt werden.
- (11) Zur Vermeidung einer Kontamination der Reagenzien ist bei jeder Abgabe eines Reagenzes, einer Probe, eines Standards und einer Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
- (12) Bei jeder Testanwendung muss eine Standardkurve erstellt werden.
- (13) Bei jeder Testanwendung sollten Kontrollen mitgetestet werden, deren Werte innerhalb der bekannten Vertrauensgrenzen liegen müssen. Die gültigen Vertrauensgrenzen der Kitkontrollen können dem QC-Report entnommen werden, der dem Kit beiliegt.
- (14) Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Chargenbezeichnungen nicht im selben Test verwenden. Reagenzien nach dem auf dem Kitetikett angegebenen Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- (15) Kontakt mit der Stopplösung vermeiden, da sie 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Die Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Berührung mit den Augen oder der Haut sofort mit Wasser aus- bzw. abspülen.
- (16) Das TMB-Substrat reizt die Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser aus- bzw. abspülen. Kontaminierte Gegenstände vor der erneuten Verwendung abspülen.
- (17) Für Informationen zu den im Kit enthaltenen gesundheitsgefährdenden Stoffen siehe das Sicherheitsdatenblatt (SDS). Das Sicherheitsdatenblatt dieses Produkts ist direkt auf der Webseite des Herstellers abrufbar oder auf Anfrage erhältlich.
- (18) Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende, potenziell infektiöse Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
- (19) Die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen erwarteten Referenzwerte dienen nur als Hinweis. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwertintervalle erstellt.
- (20) Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen sachgerecht gelagert werden, bis der Hersteller entscheidet, wie mit ihnen zu verfahren ist. Sollte entschieden werden, dass sie für Messungen nicht mehr geeignet sind, müssen sie entsprechend den nationalen Richtlinien entsorgt werden.
- (21) Die humanes Serum oder Plasma enthaltenden Reagenzien des Kits wurden mit geprüften Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Dennoch sollten sämtliche Reagenzien bei der Handhabung und Entsorgung als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandelt werden.
- (22) Therapeutische Maßnahmen dürfen sich nicht allein auf die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse stützen, sondern müssen mit anderen diagnostischen Tests und klinischen Beobachtungen abgewogen werden.

## 2.2 Grenzen des Tests

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

In etwas mehr als 10 % der Proben, die im Methodenvergleich mitgeführt wurden, gab es eine Diskrepanz zwischen den Kryptor II- und den ELISA-Messungen. Es handelte sich hierbei um Proben, deren CgA-Konzentrationen im Bereich 350–900 µg/l lagen.

Die Sequenz der verwendeten spezifischen Antikörper wurde auf möglichen Kreuzreaktionen geprüft. Auch wenn keine wesentliche Kreuzreaktivitäten nachgewiesen werden konnten, ist nicht auszuschließen, dass es in seltenen Einzelfällen und in Abhängigkeit von Medikation oder Krankheitsstatus zu Beeinflussungen der Wertelage kommen kann.

Sollte die Chromograninbestimmung im Rahmen einer Verlaufskontrolle von Patienten eingesetzt werden, empfehlen wir deshalb folgende Vorgehensweise:

- Die Proben eines Patienten sollten im Verlauf seiner Behandlung immer mit der gleichen Methode untersucht werden.
- Bei Auffälligkeiten während der Verlaufskontrolle sollte hinterfragt werden, ob Änderungen der Medikation oder des Lebensstils stattgefunden haben.

Bei weiteren Fragen hierzu, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

### 2.2.1 Interferenzen

Proben, die ein Präzipitat oder die Fibrinfäden enthalten, können zu ungenauen Ergebnissen führen. Biotin (bis zu 1200 ng/ml), hämolytische Proben (bis zu 1 mg/ml Hämoglobin), ikterische Proben (bis zu 50 mg/dl Bilirubin) und lipämische Proben (bis zu 1700 mg/dl Triglyceride) haben keinen Einfluss auf die Assayergebnisse. Es wird im Zweifel empfohlen hämolytische, ikterische und lipämische Proben nicht im Assay einzusetzen.

### 2.2.2 Beeinflussung durch Medikamente

Medikamente wie Protonenpumpenhemmer, Serotoninwiederaufnahmehemmer und Histamin Typ-2 Rezeptorantagonisten können die CgA-Konzentration im Serum beeinflussen.

### 2.2.3 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Assay nicht auf.

## 3. Lagerung und Haltbarkeit

Das Kit muss bei 2–8 °C gelagert werden. Das Kit und die Reagenzien dürfen nach Überschreiten des Verfalldatums nicht mehr verwendet werden. Einmal geöffnet sind die Reagenzien 2 Monate stabil, wenn sie bei 2–8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel der ELISA-Platte muss wieder sorgfältig verschlossen werden. Der Trockenmittelbeutel muss in der Verpackung verbleiben.

## 4. Materialien

### 4.1 Reagenzien im Kit

<b>BA E-0030</b>	<b>WASH-CONC 50x</b>	<b>Waschpufferkonzentrat</b> – 50x konzentriert, Deckel lila
Inhalt:	Puffer mit einem nicht-ionischen Detergenz und physiologischem pH	
Volumen:	1 x 20 ml/Fläschchen	
<b>TM E-9010</b>	<b>CONJUGATE</b>	<b>Antiserum Konjugat</b> – Gebrauchsfertig, Deckel rot
Inhalt:	Kaninchen Anti-Chromogranin A Antikörper, konjugiert mit Peroxidase	
Volumen:	1 x 6 ml/Fläschchen	
Beschreibung:	Spezies ist Kaninchen	
<b>BA E-0055</b>	<b>SUBSTRATE</b>	<b>Substrat</b> – Gebrauchsfertig, Deckel schwarz
Inhalt:	Chromogenes Substrat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substratpuffer und Wasserstoffperoxid	
Volumen:	1 x 12 ml/Fläschchen	

**BA E-0080** **STOP-SOLN** **Stopplösung** – Gebrauchsfertig, Deckel hellgrau

Inhalt: 0,25 M Schwefelsäure

Volumen: 1 x 12 ml/Fläschchen

Gefahren-  
hinweise:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

**TM E-9031** **W 96** **Chromogranin A Mikrotiterstreifen** – Gebrauchsfertig

Inhalt: 1 x 96 Well (12x8) Antigen vorbeschichtete Mikrotiterstreifen mit Trockenmittelbeutel in einem wiederverschließbaren Beutel

Beschreibung: Spezies ist Kaninchen

**TM E-9013** **ASSAY-BUFF** **Assaypuffer** – Gebrauchsfertig, Deckel blau

Inhalt: Puffer mit Proteinen und quecksilberfreien Konservierungsmitteln

Volumen: 1 x 50 ml/Fläschchen

Beschreibung: Spezies vom Protein in dem Puffer ist Rind

## 4.2 Standards und Kontrollen

Standards und Kontrollen – Gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Deckelfarbe	Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ]	CgA	Volumen/ Fläschchen
<b>TM E-9001</b>	<b>STANDARD A</b>	weiß	0		1 ml
<b>TM E-9002</b>	<b>STANDARD B</b>	hellgelb	30		1 ml
<b>TM E-9003</b>	<b>STANDARD C</b>	orange	110		1 ml
<b>TM E-9004</b>	<b>STANDARD D</b>	dunkelblau	450		1 ml
<b>TM E-9005</b>	<b>STANDARD E</b>	hellgrau	900		1 ml
<b>TM E-9051</b>	<b>CONTROL 1</b>	hellgrün		Die zu erwartenden Konzentrationen und Akzeptanzbereiche sind auf dem QC-Report angegeben.	1 ml
<b>TM E-9052</b>	<b>CONTROL 2</b>	dunkelrot			1 ml

Inhalt: Assay-Puffer mit einer definierten Menge an humanem Chromogranin A und Stabilisierungsprotein

Beschreibung: Chromogranin A stammt vom Menschen, das Stabilisierungsprotein ist bovinen Ursprungs

## 4.3 Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Materialien

- saugfähige Unterlage
- Wasser (deionisiert, destilliert oder ultra-pur)

## 4.4 Nicht im Kit enthaltene aber zur Durchführung erforderliche Geräte

- Kalibrierte Präzisionspipetten zum Pipettieren von 20–400  $\mu\text{l}$
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (manuell, halbautomatisch oder automatisch)
- Photometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten mit 450 nm- und, wenn möglich, 620–650 nm-Filter
- Mikrotiterplattenschüttler (ca. 600 rpm mit Amplitude 3 mm)
- Vortex-Mischer

## **5. Probenbehandlung und Lagerung**

### **Serum**

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

Es wird im Zweifel empfohlen hämolytische, ikterische und lipämische Proben nicht im Assay einzusetzen (siehe 2.2.1).

Werden die Proben nicht sofort für den Assay verwendet, müssen sie eingefroren gelagert werden.

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

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

## **6. Testdurchführung**

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt werden. Die Durchführung von Doppelbestimmungen wird empfohlen. Mikrotiterplatten müssen beschriftet werden (die aus dem Rahmen entnommenen Mikrotiterstreifen müssen entsprechend gekennzeichnet werden um Verwechslungen zu vermeiden).

Die Reaktion des Antikörpers, Enzymkonjugats und die Aktivität des Enzyms sind temperaturabhängig. Je höher die Temperatur ist, desto größer werden die Absorptionswerte. Entsprechende Abweichungen ergeben sich ebenfalls durch die Inkubationszeiten. Die optimale Temperatur während des Enzymimmunoassays liegt zwischen 20–25 °C.

▲ *Der verwendete Mikrotiterplattenschüttler muss folgende Spezifikationen haben: Schüttelamplitude 3 mm; ungefähr 600 rpm. Schütteln mit abweichenden Einstellungen kann die Ergebnisse beeinflussen.*

### **6.1 Vorbereitung der Reagenzien und Hinweise**

#### **Waschpuffer**

20 ml **WASH-CONC 50X** mit Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml verdünnen.

Lagerung: 2 Monate bei 2–8 °C

#### **Chromogranin A Mikrotiterstreifen**

Vereinzelt können Rückstände der Blockier- und Stabilisierlösung in den Wells zu sehen sein (kleine weiße Punkte oder Linien). Diese stellen keine Beeinträchtigung der Qualität des Produktes dar.



## 6.2 Probenvorbereitung – Verdünnung

Die Proben werden vor ihrer Verwendung im ELISA mit **ASSAY-BUFF** 1+20 verdünnt z.B. 20 µl Serum Probe + 400 µl **ASSAY-BUFF**.

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

## 6.3 Chromogranin A ELISA

1. Jeweils **50 µl Standards, Kontrollen und vorverdünnte Proben** in die entsprechenden Wells der **Chromogranin A Mikrotiterstreifen  $\mu$  96** pipettieren und **1 h** bei **RT** (20–25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
2. Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells **4-mal** gründlich mit **300 µl Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
3. Jeweils **50 µl CONJUGATE** in jedes Well pipettieren und **1 h** bei **RT** (20–25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.
4. Den Inhalt der Wells ausleeren oder absaugen. Die Wells **4-mal** gründlich mit **300 µl Waschpuffer** waschen, **ausleeren** und die Restflüssigkeit **jedes Mal** durch **Ausklopfen** auf einer saugfähigen Unterlage entfernen.
5. Jeweils **100 µl SUBSTRATE** in jedes Well pipettieren.
6. Für **25 ± 5 Min** bei **RT** (20–25 °C) auf einem **Schüttler** (ca. 600 rpm) inkubieren.  
**Direktes Sonnenlicht vermeiden!**
7. **100 µl STOP-SOLN** in alle Wells pipettieren und die Mikrotiterplatte kurz schütteln.
8. **Absorption** mit einem Mikrotiterplatten-Reader bei **450 nm** (falls vorhanden, gegen eine Referenzwellenlänge von 620–650 nm) innerhalb von 10 Min **messen**.

## 7. Berechnung der Ergebnisse

Messbereich	Chromogranin A in Serum
	2,3–900 µg/l

Die Standardkurve, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekanntenen Proben ermittelt werden kann, wird durch Auftragen der gemessenen Standard-Absorptionen (linearer Maßstab auf der y-Achse) gegen die entsprechenden Standardkonzentrationen (logarithmischer Maßstab auf der x-Achse) unter Verwendung einer Konzentration von 0,001 µg/l für Standard A (diese Ausrichtung ist aufgrund der logarithmischen Darstellung der Daten erforderlich) erstellt.

Für die Auswertung wird eine nicht-lineare Regression (z.B.: 4-parameter, marquardt) verwendet.

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

Proben, deren Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (Standard E) gefunden werden, müssen mit dem Assaypuffer **ASSAY-BUFF** verdünnt und erneut bestimmt werden.

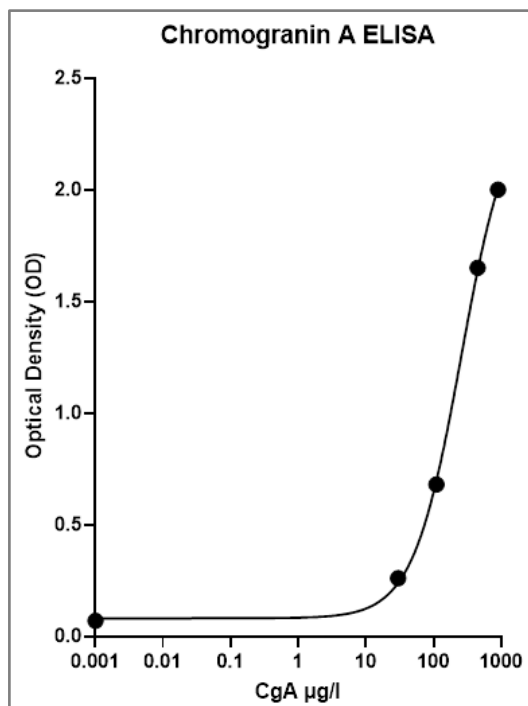
### 7.1 Erwartete Referenzbereiche

Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzwert ermittelt.

	Chromogranin A in Serum
Referenzbereich (ULN) [7]	<100 µg/l
Typischer pathologischer Bereich [7]	Bis zu 143500 µg/l

## 7.2 Typische Standardkurve

⚠ *Beispiel: Bitte nicht für die Auswertung verwenden!*



## 8. Kontrollproben

Es wird empfohlen, mit jeder Testserie entweder die Kitkontrollen und/oder andere kommerzielle Kontrollproben im normalen und pathologischen Bereich mitzubestimmen, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Kommerzielle Kontrollproben müssen dabei wie die unbekanntenen Proben behandelt werden. Die Kontrollproben müssen innerhalb der Vertrauensbereiche liegen. Die Vertrauensbereiche der Kitkontrollen sind im QC-Report aufgeführt.

## 9. Assaycharakteristika

### 9.1 Leistungsdaten

Präzision					
Intra-Assay			Inter-Assay		
n = 12			n = 10		
Probe	Mittelwert ± SD [µg/l]	CV [%]	Probe	Mittelwert ± SD [µg/l]	CV [%]
1	43,6 ± 1,2	2,8	1	73,0 ± 3,8	5,2
2	73,5 ± 3,0	4,2	2	102 ± 3,5	3,5
3	103 ± 3,4	3,3	3	161 ± 5,7	3,6
4	161 ± 10,1	6,3	4	300 ± 16,0	5,3
5	283 ± 14,6	5,1			
6	502 ± 15,9	3,2			

Analytische Sensitivität	
Limit of Blank (LOB)	0,9 µg/l
Limit of Detection (LOD)	1,4 µg/l
Limit of Quantification (LOQ)	2,3 µg/l

<b>Wiederfindung</b>		Bereich [ $\mu\text{g/l}$ ]	Mittelwert [%]	Bereich [%]
	Chromogranin A	43,6–502	101	95–104

<b>Linearität</b>		Serielle Verdünnung bis	Mittelwert [%]	Bereich [%]
	Chromogranin A	1:64	92	91–96

<b>Methodenvergleich: B.R.A.H.M.S CgA II Kryptor</b>	CgA ELISA = $1,05 \times (\text{Kryptor}) - 15$ ; $R^2 = 0,97$ ; $n = 57$
--	---

<b>Lot to Lot</b>		Probe	Bereich [ng/ml] Mittelwert $\pm$ SD	CV [%]
	Chromogranin A in serum (n = 4)	1	42,5 $\pm$ 2,5	6
		2	111 $\pm$ 3,2	3
		3	500 $\pm$ 20,9	4

<b>Klinische Leistung [7] GEP-NET</b>	Diagnostische Spezifität [%]	Diagnostische Sensitivität [%]	Positiver Prädiktiver Wert (PPV) [%]	Negativer Prädiktiver Wert (NPV) [%]
	83	56	87	49
	Positives Likelihood Ratio (LR+)		Negatives Likelihood Ratio (LR-)	
	3,3		0,53	

## 9.2 Metrologische Rückführbarkeit

Die zugeordneten Werte der Standards und Kontrollen vom Chromogranin A ELISA sind auf die B.R.A.H.M.S CgA II Kryptor Methode rückführbar.

<b>Standards und Kontrollen</b>	Unsicherheit [%]
	7,5

<b>Chromogranin A ELISA</b>	Erweiterte Unsicherheit [%] $k = 2^*$
	16,5

\* Das Intervall der maximalen erweiterten Unsicherheit ist der Bereich, in dem der wahre Messwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % um den gemessenen Wert liegt.

## 10. Referenzen/Literatur












- O'Toole, D., et al., *ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: biochemical markers*. Neuroendocrinology, 2009. **90**(2): p. 194–202.
- Verbeek, W.H., C.M. Korse, and M.E. Tesselaaar, *GEP-NETS UPDATE: Secreting gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours and biomarkers*. Eur J Endocrinol, 2016. **174**(1): p. R1–7.
- Singh, S. and C. Law, *Chromogranin A: a sensitive biomarker for the detection and post-treatment monitoring of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **6**(3): p. 313–34.
- Louthan, O., *Chromogranin a in physiology and oncology*. Folia Biol (Praha), 2011. **57**(5): p. 173–81.
- Yang, X., et al., *Diagnostic value of circulating chromogranin a for neuroendocrine tumors: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0124884.
- Corti, A., F. Marcucci, and T. Bachetti, *Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers*. Pflugers Arch, 2018. **470**(1): p. 199–210.

7. van Treijen, M.J.C., et al., *Blood Transcript Profiling for the Detection of Neuroendocrine Tumors: Results of a Large Independent Validation Study*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 740.

**11. Änderungen**

Version	Freigabedatum	Kapitel	Änderung
18.0	2021-07-09	Alle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Überarbeitung des Assays aufgrund eines Lotwechsels des verwendeten abgestimmtem Antikörperpaares</li> <li>- Die IFU wurde gemäß der IVDR-Verordnung (EU) 2017/746 überarbeitet</li> <li>- Probenverdünnung wurde von 1+8 auf 1+20 geändert (Kapitel 6.2)</li> <li>- Typischer pathologischer Bereich wurde hinzugefügt (Kapitel 7.1)</li> <li>- Assay-Charakteristika wurden geändert (Kapitel 9.1)</li> <li>- Lot to Lot und diagnostische Leistung wurden zu den Assay-Charakteristika hinzugefügt</li> <li>- Metrologische Rückführbarkeit wurde hinzugefügt (Kapitel 9.2)</li> <li>- Referenzen/Literatur wurde aktualisiert (Kapitel 10)</li> </ul>

**Symbole:**

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