



# **CHROMOGRANIN A - RIA**

***KIPERB321***



# History

---

## Summary of change:

<b>Previous Version:</b> <b>200224-1</b>	<b>Current Version:</b> <b>200618</b>
No German version	German version added
No Italian version	Italian version added

Read entire protocol before use.

# Chromogranin A-RIA

## I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of chromogranin A in human serum or plasma.

## II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource Chromogranin A-RIA
- B. **Catalog number :** KIPERB321 : 100 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**For technical assistance or ordering information contact :**  
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

## III. CLINICAL BACKGROUND

### 1. Biological activities

Chromogranins and secretogranins constitute a family of uniquely acidic proteins that are co-stored with neurotransmitters and peptide hormones in the brain and the diffuse neuroendocrine system (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). Structurally these proteins are products of different genes but share some overall properties such as an abundance of acidic amino acid residues and several pairs of basic amino acids as potential positions for post-translational cleavage. Chromogranins are co-stored and co-released with neuropeptides and hormones in the neuroendocrine cells throughout the body. A role for chromogranins in the generation of hormonal granules and package of hormones has been suggested. Furthermore, chromogranins can be cleaved into smaller fragments, which can display biological activities such as inhibition of hormonal release, vasodilatation and anti-microbiological effects.

Tumours of neuroendocrine origin usually present with increased serum/plasma levels of chromogranin A. The neuroendocrine tumours are derived from the neuroendocrine cells and typical neuroendocrine tumours are carcinoid tumours, pheochromocytomas, neuroblastomas, small cell lung cancers, hyperparathyroid adenomas, pituitary tumours, prostate cancers and pancreatic islet tumours and including the MEN1 and MEN2 syndromes. This also includes the different neuroendocrine tumour syndromes, namely the gastrinomas, insulinomas, glucagonomas, somatostatinomas, PPomas and the non-functioning neuroendocrine tumours (Eriksson, B. et al. 2000). For these tumours, chromogranin A has been shown to be the best circulating marker (Bajetta, E. et al. 1999).

The first radioimmunoassay for measurements of chromogranin A was introduced in 1986 (O'Connor, D.T. & Deftos, L.J. 1986). Since then other assays for measurements of intact human chromogranin A have been reported. Assays for measurements of defined regions of chromogranin A have also been established, such as specific methods for pancreastatin and other regions of chromogranin A (Stridsberg, M. 2000).

The present chromogranin A is a competitive method based on polyclonal antibodies raised in rabbits. The antibodies were raised against a purified fragment containing amino acid sequence 116-439 in the chromogranin A molecule.

### 2. Clinical application

Tumours of neuroendocrine origin usually present with increased serum/plasma levels of chromogranin A. The neuroendocrine tumours are derived from the neuroendocrine cells.

Typical neuroendocrine tumours are carcinoid tumours, pheochromocytomas, neuroblastomas, small cell lung cancers, hyperparathyroid adenomas, pituitary tumours, prostate cancers and pancreatic islet tumours and including the MEN1 and MEN2 syndromes. This also includes the different neuroendocrine tumour syndromes, namely the gastrinomas, insulinomas, glucagonomas, somatostatinomas, PPomas and the non-functioning neuroendocrine tumours.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The basic principle for determination of chromogranin A with the DIASource chromogranin A RIA kit is the competitive radioimmunoassay using antibodies against human chromogranin A.

Chromogranin A in calibrators and samples compete with <sup>125</sup>I-labelled chromogranin A in binding to the antibodies. The <sup>125</sup>I-chromogranin A binds to the antibodies in an inverse proportion to the concentration of chromogranin A in calibrators and samples. Antibody-bound <sup>125</sup>I-chromogranin A is separated from the unbound fraction using the double antibody solid phase technique. The bound fraction of <sup>125</sup>I-chromogranin A is measured in a gamma counter.

For professional use within a laboratory.

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution		
<b>[ANTISERUM]</b> Rabbit antiserum to human chromogranin A (amino acids 116-439). The antiserum is diluted and lyophilised in phosphate buffer with bovine serum albumin, NaCl, and Tween 20.	1 vial lyophilised	Blue	Add 11 mL distilled water		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="padding: 2px;">Ag</td><td style="padding: 2px;"><sup>125</sup>I</td></tr></table> TRACER: <sup>125</sup> Iodine labelled Chromogranin A in phosphate buffer with bovine albumin, NaCl, NaN <sub>3</sub> and Tween 20.	Ag	<sup>125</sup> I	1 vial lyophilised 56 kBq	Red	Add 12.5 mL distilled water
Ag	<sup>125</sup> I				
<b>[DASP]</b> Double antibody solid phase : Anti-rabbit-Ig coupled to cellulose particles in phosphate buffer with bovine serum albumin, NaCl, NaN <sub>3</sub> and Tween 20.	1 vial 52 mL	Green	Ready for use		
<b>[ASS BUF]</b> Assay buffer : phosphate buffer containing bovine serum albumin, sodium azide, NaCl and Tween 20. Buffer used for dilution of samples, preparation of working calibrators and for replacement of antiserum in non-specific binding controls.	1 vial 50 mL	Black	Ready for use		
<b>[CAL]</b> Chromogranin A calibrator in phosphate buffer containing bovine serum albumin, sodium azide (<0.1%), NaCl and Tween 20.	1 vial lyophilised	Yellow	Reconstitute with distilled water by the volume stated on the vial label		
<b>[CONTROL N]</b> Controls - N = 1 or 2 Lyophilised controls with two different levels of chromogranin A. <b>The chromogranin A concentrations are given on the labels of the vials.</b> The controls should not be diluted after reconstitution.	2 vials lyophilised	Silver	Add 1 mL distilled water		

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water.
2. Disposable test tubes 11-13 x 55 mm, (polystyrene).
3. Pipettes with disposable tips, 50, 100 and 500 µL.
4. Volumetric pipettes 1.00 and 5.00 mL
5. Vortex mixer.
6. Centrifuge, refrigerated, minimum g-force 1700 x g.
7. Gamma counter.

#### VII. REAGENT PREPARATION

- A. Antiserum:** Reconstitute with 11 mL distilled water. Store at 2-8° C.

- B. <sup>125</sup>I-Chromogranin A :** Reconstitute with 12.5 mL distilled water. Store at -20° C or lower if reused.
- C. Double antibody solid phase :** Ready for use. Stir continuously during pipetting this reagent. Store at 2-8° C.
- D. Assay buffer :** Ready for use. Store at 2-8° C.
- E. Chromogranin A Calibrator :** Reconstitute with distilled water by the volume stated on the vial label. Store at -20° C or lower if reused.
- F. Controls :** Reconstitute each vial with 1 mL distilled water. Store at -20° C or lower if reused.

#### VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

Store all reagents at 2-8° C before reconstitution and use.

The water used for reconstitution of the lyophilised reagents should be distilled in an all-glass apparatus or be of corresponding purity.

Dissolve the contents in the vials by gentle inversion and avoid foaming.

The stability of the reagents is found on the labels of the vials.

For lyophilised reagents the expiry date is valid for the unconstituted reagents.

Reconstituted reagents are stable for 12 weeks.

#### IX. SPECIMEN COLLECTION

Vein blood is collected in tubes without additives or in tubes containing Heparin (144 U.S.P. Heparin in a 10 mL tube), EDTA or Lithium. The samples are cooled in an ice-bath. The samples are separated by centrifugation at 2-4° C and stored at -20° C or lower. The samples should be frozen at -20° C within three hours from sample collection.

#### X. PROCEDURE

##### A. Handling notes

Reconstitute the reagents as specified. The reagents should be brought to room temperature prior to use.

Accuracy in all pipetting steps is essential. All tests (calibrators, controls and samples) should be performed in duplicate.

A complete assay includes:

Calibrators: 7 different concentrations, 0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.50 and 5.00 nmol/L.

Controls: Low and high.

Samples

Tubes for determination of the non-specific binding (NSB-tubes)

Tubes for determination of the total radioactivity added (TOT-tubes).

##### Dilution of samples

Samples should be diluted 1:10 with the Assay buffer before assay.

Samples with chromogranin A concentrations more than 50 nmol/L can be diluted further with Assay buffer, and re-assayed.

##### B. Procedure

1. Reconstitute the lyophilised reagents according to the instructions and allow the reagents to reach room temperature.
2. Prepare the chromogranin A working calibrators by dilution of the chromogranin A calibrator 10.00 nmol/L with assay buffer according to the following:
  - a. 0.40 mL calibrator 10.00 nmol/L + 0.40 mL Assay buffer = 5.00 nmol/L
  - b. 0.40 mL calibrator 5.00 nmol/L + 0.40 mL Assay buffer = 2.50 nmol/L
  - c. 0.40 mL calibrator 2.50 nmol/L + 0.40 mL Assay buffer = 1.25 nmol/L
  - d. 0.40 mL calibrator 1.25 nmol/L + 0.40 mL Assay buffer = 0.625 nmol/L
  - e. 0.40 mL calibrator 0.625 nmol/L + 0.40 mL Assay buffer = 0.313 nmol/L
  - f. 0.40 mL calibrator 0.313 nmol/L + 0.40 mL Assay buffer = 0.156 nmol/L
  - g. Assay buffer = 0 nmol/L

Store the calibrators at -20° C or lower if reused.
3. Dilute the samples 1:10 with Assay buffer e.g. 50 µL sample and 450 µL Assay buffer. Vortex-mix carefully.
4. Pipette 100 µL of calibrators (0-5.00 nmol/L), controls and samples in their respective tubes.
5. Pipette 100 µL of zero-calibrator (assay buffer) in the NSB-tubes.
6. Pipette 100 µL <sup>125</sup>I-chromogranin A in all tubes. The TOT-tubes are sealed and kept aside.
7. Pipette 100 µL Antiserum in all tubes except the NSB-tubes and TOT-tubes.
8. Pipette 100 µL Assay buffer in the NSB-tubes.
9. Vortex-mix all tubes carefully.
10. Incubate for 20-24 hours at 2-8° C.
11. Pipette 500 µL double antibody solid phase in all tubes except the TOT-tubes. This reagent should be stirred continuously with a magnetic stirrer during pipetting.  
Vortex-mix carefully.
12. Incubate for 30-60 minutes at 2-8° C.
13. Centrifuge for 15 minutes at +4° C (minimum 1700 x g).

14. Decant the supernatants.
15. Count the radioactivity of the pellet in all tubes in a gamma counter.  
Counting time: 1-3 minutes.

	1	2
Mean value (nmol/L)	3.47	9.80
SD	0.22	0.62
% CV	6.34	6.36

#### XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Subtract the average count rate (CPM) of the NSB-tubes from the count rate (CPM) of the calibrators, controls and samples.
2. A calibration curve is generated by plotting the bound fraction CPM or B/TOT against the concentrations of the chromogranin A calibrators.
3. Interpolate the chromogranin A concentrations of the controls and samples from the generated calibration curve. Multiply the found concentrations in the samples with the dilution factor 10 (or actual dilution factors if further dilution has been done).
4. The calibration curve and the calculation of the chromogranin A concentrations in samples and controls can also be done by a computer method.

#### XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

Type of tube	Average CPM	Corrected CPM	B/T %	B/B0 %
<b>Total counts</b>	22798			
<b>NSB</b>	494			
<b>Calibrator 0 nmol/L</b>	8430	7936	35	100
<b>Calibrator 0.156 nmol/L</b>	7171	6677	29	84
<b>Calibrator 0.313 nmol/L</b>	6384	5830	26	73
<b>Calibrator 0.625 nmol/L</b>	5468	4974	22	63
<b>Calibrator 1.25 nmol/L</b>	4359	3865	17	49
<b>Calibrator 2.50 nmol/L</b>	3318	2824	12	36
<b>Calibrator 5.00 nmol/L</b>	2485	1991	9	25

#### XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

##### A. Sensitivity

The LOB (Limit of Blank) was calculated by measuring the blank 20 times and was calculated as the mean -2 standard deviations of the distribution of the test values. The LOB was calculated to be 0.02nmol/l.

The LOD (limit of Detection) was calculated as the LOB -1.65 standard deviations of a low concentration sample tested in 12 different run. The LOD was calculated to be 0.19nmol/l.

The LOQ (Limit of Quantification) was calculated by testing 5 samples of low value 12 times. The LOQ was calculated to be 1.9nmol/l with CV of 20%.

##### B. Precision

Intra-assay precision was determined by testing 2 different samples in 10 replicates at one occasion.

	1	2
Mean value (nmol/L)	3.12	9.63
SD	0.19	0.58
% CV	6.05	6.02

Inter-assay precision was determined by testing 2 different samples in 10 replicates at three separate occasions.

##### C. Specificity

92 serum samples from apparently healthy blood donors were tested, 87 out of 92 were negative, with values  $\leq 3$  nmol/l.

##### D. Dilution recovery

Dilution recovery was determined by testing five serial dilutions for three different samples.

Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (nmol/L)	Theoretical Concentration (nmol/L)	Dilution Corrected % Recovery
1	1/1	23.4	23.4	100%
	1/2	11.8	11.7	100.8%
	1/4	5.7	5.85	97.4%
	1/8	3.0	2.93	102.5%
	1/16	1.7	1.46	116.2%
Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (nmol/L)	Theoretical Concentration (nmol/L)	Dilution Corrected % Recovery
2	1/1	27.4	27.4	100%
	1/2	14.6	13.7	106.5%
	1/4	7.3	6.8	106.5%
	1/8	3.0	3.4	87.6%
Sample	Dilution	Mean Measured Concentration (nmol/L)	Theoretical Concentration (nmol/L)	Dilution Corrected % Recovery
3	1/1	30.1	30.1	100%
	1/2	12.4	15.0	82.3%
	1/4	6.5	7.5	86.3%
	1/8	3.5	3.7	93.0%
	1/16	2	1.8	106.3%

##### E. Interference

Samples displaying cloudiness, haemolysis, hyperlipemia or containing fibrin may give inaccurate results.

#### XIV. INTERNAL QUALITE CONTROL

In order to enable the laboratory to completely monitor the consistent performance of the assay, the following important factors should be checked.

##### 1. Controls

The found concentrations of the controls should be within the limits given on the labels of the vials.

##### 2. Total counts

Counts obtained should approximate the expected CPM when adjusted for counter efficiency and radioactive decay. The content of  $^{125}\text{I}$ -chromogranin A in this kit will give a total counts in the assay (TOT) of 21.000 CPM (-10, +20%) at the activity reference date (counting efficiency = 80%).

##### 3. Maximum binding (Bo/TOT)

Calculate for each assay the % bound radioactivity in the zero-calibrator:

$$\frac{B_0}{TOT} \times 100$$

TOT

##### 4. Non-specific binding (NSB/TOT)

Calculate for each assay the % non-specific binding:

$$\frac{NSB}{TOT} \times 100$$

TOT

The non-specific is less than 6% if decanting is made properly.

## 5. Shape of calibration curve

For example, monitor the 80, 50 and 20% points of the calibration curve for run to run reproducibility.

## XV. REFERENCE INTERVALS

Reference range, serum:  $\leq 3.0$  nmol/L.

The reference range was set by testing 92 blood donors. The population consists of 49 males and 43 females, from 18 to 65 years old.

The interval of values found from 5 to 95 percentiles is: 1.6 to 3.1 nmol/l. The median is calculated at 2.15 nmol/l.

It is recommended that users establish reference ranges for the populations served by their own laboratories.

## Non-tumour associated increases of chromogranin A

Increased levels of chromogranin A can be seen in patients with decreased renal function, patients with atrophic gastritis and patients with ongoing treatments with proton-pump inhibitory drugs.

## XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For in vitro diagnostic use only.

As the regulations may vary from one country to another, it is essential that the person responsible for the laboratory is familiar with current local regulations, concerning all aspects of radioactive materials of the type and quantity used in this test.

This kit contains components of human origin. They have been tested by immunoassay for hepatitis B surface antigen, antibodies to HCV and for antibodies to HIV-1 and HIV-2 and found to be negative. Nevertheless, all recommended precautions for the handling of blood derivatives should be observed.

This kit contains  $^{125}\text{I}$  (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (35.5 keV) radiations. Steps should be taken to ensure the proper handling of the radioactive material, according to local and/or national regulations. Only authorized personnel should have access to the reagents.

The following precautions should be observed when handling radioactive materials:

- Radioactive material should be stored in specially designated areas, not normally accessible to unauthorized personnel.
- Handling of radioactive material should be conducted in authorized areas only.
- Care should be exercised to prevent ingestion and contact with the skin and clothing. Do not pipette radioactive solutions by mouth.
- Drinking, eating or smoking should be prohibited where radioactive material is being used.
- Hands should be protected by gloves and washed after using radioactive materials.
- Work should be carried out on a surface covered by disposable absorbing material.
- Spills of radioactive material should be removed immediately, and all contaminated materials disposed as radioactive waste. Contaminated surfaces should be cleaned with a detergent.

The reagents in this kit contain sodium azide. Contact with copper or lead drainpipes may result in the cumulative formation of highly explosive azide deposits. On disposal of the reagents in the sewerage, always flush with copious amounts of water, which prevents metallic azide formation. Plumbing suspected of being contaminated with these explosive deposits should be rinsed thoroughly with 10% sodium hydroxide solution.

## XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregni, E. and Bombardieri, E. Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours. *Cancer* 1999, 86:858-865.
2. Eriksson, B., Öberg, K. and Stridsberg, M. Tumour markers in neuroendocrine tumours. *Digestion* 2000, 62:33-38.
3. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *New England Journal of Medicine* 1986, 314:1145-1151.
4. Stidsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K. Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments. *Journal of Endocrinology* 1993, 139:329-337.

5. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *Journal of Endocrinology* 1995, 144:49-59.
6. Stridsberg, M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods. *Advanced Experimental and Medical Biology* 2000, 482:319-327.
7. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R. The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992, 49:497-528.
8. Jansson, A. M., Røsjø, H., Omland, T., Karlsson, T., Hartford, M., Flyvbjerg, A. and Caidahl, K. Prognostic value of circulating chromogranin A levels in acute coronary syndromes. *European Heart Journal* 2009, 30:25-32.

## XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Total count	NSB	Calibrators (0-6)	Controls	Samples
Calibrators	-	-	100 $\mu\text{L}$	-	-
Controls	-	-	-	100 $\mu\text{L}$	-
Samples	-	-	-	-	100 $\mu\text{L}$
Assay buffer	-	100 $\mu\text{L}$	-	-	-
$^{125}\text{I}$ Tracer	100 $\mu\text{L}$				
Antiserum	-	-	100 $\mu\text{L}$		
Assay buffer	-	100 $\mu\text{L}$	-		
Vortex-mix and incubate for 20-24 hours at 2-8°C.					
Double antibody solid phase	-	500 $\mu\text{L}$			
Vortex-mix and incubate for 30-60 min at 2-8°C.					
Centrifuge 15 min ( 1700 g; 4°C )					
Decant and count the radioactivity of the pellets					

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

DIAsource Catalogue Nr : KIPERB321	Revision nr : 200618
---------------------------------------	-------------------------

Revision date : 18/06/2020

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

# Chromogranin A-RIA

## I. VERWENDUNGSZWECK

Radioimmunassay für die quantitative In-vitro-Messung von Chromogranin A in menschlichem Serum und Plasma

## II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung:** DIAsource Chromogranin A-RIA
- B. **Katalognummer:** KIPERB321: 100 Tests
- C. **Hersteller:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

**Für technische Unterstützung oder Bestellinformationen wenden Sie sich bitte an:**  
**Tel.: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91**

## III. KLINISCHER HINTERGRUND

### 1. Biologische Aktivität

Chromogranine und Sekretogranine bilden eine Familie einzigartiger saurer Proteine, die zusammen mit Neurotransmittern und Peptidhormonen in das Gehirn und das diffuse neuroendokrine System eingelagert werden (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). Strukturell stammen diese Proteine zwar von unterschiedlichen Genen, aber sie teilen manche allgemeinen Eigenschaften, haben eine Reihe von Aminosäuren gemeinsam und mehrere Paare basischer Aminosäuren als potentielle Positionen für post-translationale Gruppierungen. Chromogranine werden zusammen mit Neuropeptiden und Hormonen in den neuroendokrinen Zellen des gesamten Körpers gespeichert und gemeinsam mit diesen freigesetzt. Es wird vermutet, dass Chromogranine eine Rolle bei der Bildung von Hormonkörnchen und -paketen spielt. Weiterhin können Chromogranine in kleinere Fragmente gespalten werden, die auch biologische Aktivitäten zeigen können, wie die Inhibierung der Hormonfreisetzung, Gefäßerweiterung und antimikrobielle Effekte.

Tumoren neuroendokrinen Ursprungs gehen normalerweise einher mit erhöhten Chromogranin-A-Plasmakonzentrationen. Neuroendokrine Tumoren werden von den neuroendokrinen Zellen gebildet. Beispiele für typische neuroendokrine Tumoren sind Krebs tumoren, Phäochromozytome, Neuroblastome, kleinzellige Lungenkarzinome, hyperparathyreoidale Adenome, Hypophysentumoren, Prostatakarzinom und Inselzelltumoren des Pankreas sowie die MEN1- und MEN2-Syndrome. Auch die verschiedenen neuroendokrinen Tumorsyndrome, in erster Linie die Gastrinome, Insulinome, Glucagonome, Somatostatinome gehören hierzu. PPome und die nicht funktionierenden neuroendokrinen Tumoren (Eriksson, B. et al. 2000). Für diese Tumoren hat sich Chromogranin A als der beste zirkulierende Marker erwiesen (Bajetta, E. et al. 1999).

Der erste Radioimmunassay für die Messung von Chromogranin A wurde 1986 eingeführt (O'Connor, D.T. & Deftos, L.J. 1986). Seither wurden andere Assays zur Messung von intaktem humanem Chromogranin A vorgestellt. Assays zur Messung von bestimmten Regionen des Chromogranin A wurden ebenso etabliert, wie spezifische Methoden für Pankreastatin und andere Regionen des Chromogranin A (Stridsberg, M. 2000).

Das vorliegende Chromogranin A ist eine kompetitive Methode mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern. Die Antikörper sind gegen ein gereinigtes Fragment mit der Aminosäuresequenz 116-439 im Chromogranin A-Molekül gerichtet.

### 2. Klinische Anwendung

Tumoren neuroendokrinen Ursprungs weisen in der Regel erhöhte Serum-/Plasmakonzentrationen von Chromogranin A auf. Die neuroendokrinen Tumoren werden von den neuroendokrinen Zellen gebildet.

Typische neuroendokrine Tumoren sind Karzinoidtumoren, Phäochromozytome, Neuroblastome, kleinzellige Lungenkarzinome, hyperparathyreoidale Adenome, Hypophysentumoren, Prostatakarzinome und Inselzelltumoren des Pankreas einschließlich der MEN1- und MEN2-Syndrome. Auch die verschiedenen neuroendokrinen Tumorsyndrome, nämlich die Gastrinome, Insulinome, Glucagonome, Somatostatinome, PPome und die nicht funktionierenden neuroendokrinen Tumoren gehören dazu.



#### IV. GRUNDSÄTZE DER METHODE

Das Grundprinzip für die Bestimmung von Chromogranin A mit dem DIASource-Chromogranin-A-RIA-Kit ist der kompetitive Radioimmunassay unter Verwendung von Antikörpern gegen humanes Chromogranin A.

Chromogranin A in Kalibratoren und Proben konkurriert mit <sup>125</sup>I-markiertem Chromogranin A bei der Bindung an die Antikörper. Das <sup>125</sup>I-Chromogranin A bindet an die Antikörper in einem umgekehrten Verhältnis zur Konzentration von Chromogranin A in Kalibratoren und Proben. Antikörpergebundenes <sup>125</sup>I-Chromogranin A wird mit Hilfe der Doppelantikörper-Festphasentechnik von der ungebundenen Fraktion getrennt. Die gebundene Fraktion von <sup>125</sup>I-Chromogranin A wird in einem Gammazähler gemessen.

Für den professionellen Einsatz innerhalb eines Labors.

#### V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	100 Tests Kit	Farbcode	Rekonstitution		
<b>[ANTISERUM]</b> Kaninchen-Antiserum gegen humanes Chromogranin A (Aminosäuren 116-439). Das Antiserum wird in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin, NaCl und Tween 20 verdünnt und lyophilisiert.	1 Fläschchen lyophilisiert	Blau	11 ml destilliertes Wasser <b>hinzufügen</b>		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td style="padding: 2px;">Ag</td><td style="padding: 2px;"><sup>125</sup>I</td></tr></table> TRACER: <sup>125</sup> Jod-markiertes Chromogranin A in Phosphatpuffer mit Rinderalbumin, NaCl, NaN <sub>3</sub> und Tween 20	Ag	<sup>125</sup> I	1 Fläschchen lyophilisiert 56 kBq	Rot	12,5 ml destilliertes Wasser <b>hinzufügen</b>
Ag	<sup>125</sup> I				
<b>[DASP]</b> Doppel-Antikörper-Festphase: Anti-Kaninchen-Ig gekoppelt an Cellulosepartikel in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin, NaCl, NaN <sub>3</sub> und Tween 20.	1 Fläschchen 52 ml	Grün	<b>Gebrauchsfertig</b>		
<b>[ASS BUF]</b> Testpuffer : Phosphatpuffer, der Rinderserumalbumin, Natriumazid, NaCl und Tween 20 enthält. Puffer, der zur Verdünnung von Proben, zur Herstellung von Arbeitskalibratoren und zum Ersatz von Antiserum in nicht-spezifischen Bindungskontrollen verwendet wird.	1 Fläschchen 50 ml	Schwarz	<b>Gebrauchsfertig</b>		
<b>[CAL]</b> Chromogranin A-Kalibrator in Phosphatpuffer, der Rinderserumalbumin, Natriumazid (< 0,1 %), NaCl und Tween 20 enthält.	1 Fläschchen lyophilisiert	Gelb	Mit destilliertem Wasser mit dem auf dem Fläschchenetikett angegebenen Volumen <b>rekonstituieren</b>		
<b>[CONTROL N]</b> Kontrollen - N = 1 oder 2 Lyophilisierte Kontrollen mit zwei verschiedenen Chromogranin-A-Konzentrationen. <b>Die Chromogranin A-Konzentrationen sind auf den Etiketten der Fläschchen angegeben.</b> Die Kontrollen sollten nach der Rekonstitution nicht verdünnt werden.	2 Fläschchen lyophilisiert	Silber	1 ml destilliertes Wasser <b>hinzufügen</b>		

#### VI. NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Destilliertes Wasser.
2. Einweg-Reagenzgläser 11–13 x 55 mm, (Polystyrol).
3. Pipetten mit Einwegspitzen, 50, 100 und 500 µl.
4. Vollpipetten 1,00 und 5,00 ml
5. Vortexmixer.
6. Zentrifuge, gekühlt, minimale g-Kraft 1700 x g.
7. Gamma-Zähler.

#### VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Antiserum:** Mit 11 ml destilliertem Wasser rekonstituieren. Bei 2–8 °C lagern.
- B. <sup>125</sup>I-Chromogranin A:** Mit 12,5 ml destilliertem Wasser rekonstituieren. Bei Wiederverwendung bei -20 °C oder niedriger lagern.
- C. Doppel-Antikörper-Festphase:** Gebrauchsfertig. Während des Pipettierens dieses Reagenz kontinuierlich rühren. Bei 2–8 °C lagern.
- D. Testpuffer:** Gebrauchsfertig. Bei 2–8 °C lagern.
- E. Chromogranin A-Kalibrator:** Mit destilliertem Wasser mit dem auf dem Fläschchenetikett angegebenen Volumen **rekonstituieren**. Bei Wiederverwendung bei -20 °C oder niedriger lagern.
- F. Kontrollen:** Jedes Fläschchen mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituieren. Bei Wiederverwendung bei -20 °C oder niedriger lagern.

#### VIII. AUFBEWAHRUNG UND VERFALLDATUM DER HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien vor der Rekonstitution und Verwendung bei 2–8 °C lagern.

Das für die Rekonstitution der lyophilisierten Reagenzien verwendete Wasser sollte in einer Ganzglasapparatur destilliert werden oder von entsprechender Reinheit sein.

Den Inhalt in den Fläschchen durch sanfte Inversion auflösen und Schaumbildung vermeiden.

Die Stabilität der Reagenzien ist auf den Etiketten der Fläschchen zu finden.

Bei lyophilisierten Reagenzien gilt das Verfallsdatum für die nicht rekonstituierten Reagenzien.

Nach Rekonstitution haben die Reagenzien eine Haltbarkeit von 12 Wochen.

#### IX. PROBENENTNAHME

Venenblut wird in Röhrchen ohne Zusätze oder in Röhrchen mit Heparin (144 U.S.P. Heparin in einem 10 mL Röhrchen), EDTA oder Lithium entnommen. Die Proben werden in einem Eisbad gekühlt. Die Proben werden durch Zentrifugieren bei 2–4 °C getrennt und bei -20 °C oder niedriger gelagert. Die Proben sollten innerhalb von drei Stunden nach der Probenentnahme bei -20 °C eingefroren werden.

#### X. VERFAHREN

##### A. Hinweise zur Handhabung

Die Reagenzien wie angegeben rekonstituieren. Die Reagenzien sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden.

Die Genauigkeit bei allen Pipettierschritten ist unerlässlich. Alle Tests (Kalibratoren, Kontrollen und Proben) sollten in Doppelbestimmungen durchgeführt werden.

Ein kompletter Testansatz beinhaltet:

Kalibratoren: 7 verschiedene Konzentrationen, 0; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,50 und 5,00 nmol/l.

Kontrollen: Niedrig und hoch.

Proben

Röhrchen zur Bestimmung der nicht spezifischen Bindung (NSB-Röhrchen)

Röhrchen zur Bestimmung der zugesetzten Gesamtradioaktivität (TOT-Röhrchen).

##### Verdünnung von Proben

Die Proben sollten vor dem Test 1:10 mit dem Testpuffer verdünnt werden.

Proben mit Chromogranin-A-Konzentrationen von mehr als 50 nmol/l können mit Assay-Puffer weiter verdünnt und erneut getestet werden.

##### B. Verfahren

1. Die lyophilisierten Reagenzien entsprechend den Anweisungen rekonstituieren und die Reagenzien Raumtemperatur erreichen lassen.
2. Die Chromogranin-A-Arbeitskalibratoren durch Verdünnung des Chromogranin-A-Kalibrators 10,00 nmol/l mit Testpuffer wie folgt aufbereiten:
  - a. 0,40 ml Kalibrator 10,00 nmol/l + 0,40 ml Testpuffer = 5,00 nmol/l
  - b. 0,40 ml Kalibrator 5,00 nmol/l + 0,40 ml Testpuffer = 2,50 nmol/l
  - c. 0,40 ml Kalibrator 2,50 nmol/l + 0,40 ml Testpuffer = 1,25 nmol/l
  - d. 0,40 ml Kalibrator 1,25 nmol/l + 0,40 ml Testpuffer = 0,625 nmol/l
  - e. 0,40 ml Kalibrator 0,625 nmol/l + 0,40 ml Testpuffer = 0,313 nmol/l
  - f. 0,40 ml Kalibrator 0,313 nmol/l + 0,40 ml Testpuffer = 0,156 nmol/l
  - g. Testpuffer = 0 nmol/l

Die Kalibratoren bei -20 °C oder niedriger lagern, wenn sie wiederverwendet werden.
3. Proben 1:10 mit Testpuffer verdünnen, z. B. 50 µl Probe und 450 µl Testpuffer. Mit dem Vortexmixer sorgfältig durchmischen.

4. 100 µl Kalibratoren (0–5,00 nmol/l), Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhren pipettieren.
5. 100 µl des Null-Kalibrators (Testpuffer) in die NSB-Röhren pipettieren.
6. 100 µl <sup>125</sup>I-Chromogranin A in alle Röhren pipettieren. Die TOT-Röhren sind versiegelt und werden beiseite gehalten.
7. 100 µl Antiserum in alle Röhren mit Ausnahme der NSB-Röhren und TOT-Röhren pipettieren.
8. 100 µl Testpuffer in die NSB-Röhren pipettieren.
9. Alle Röhren mit dem Vortexmixer sorgfältig durchmischen.
10. 20–24 Stunden bei 2–8 °C inkubieren,
11. 500 µl Doppelantikörper-Festphase in alle Röhren außer den TOT-Röhren pipettieren. Dieses Reagenz sollte während des Pipettierens kontinuierlich mit einem Magnetrührer gemischt werden. Mit dem Vortexmixer sorgfältig durchmischen.
12. 30–60 Minuten bei 2–8 °C inkubieren.
13. 15 Minuten lang bei +4 °C zentrifugieren (mindestens 1700 x g).
14. Die Überstände abgießen.
15. Die Radioaktivität des Rückstands in allen Röhren in einem Gammazähler bestimmt.  
Messzeit: 1–3 Minuten.

#### XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Die durchschnittliche Zählrate (CPM) der NSB-Röhren von der Zählrate (CPM) der Kalibratoren, Kontrollen und Proben substrahieren.
2. Eine Kalibrierkurve wird durch Auftragen der gebundenen Fraktion CPM oder B/TOT gegen die Konzentrationen der Chromogranin-A-Kalibratoren erstellt.
3. Die Chromogranin-A-Konzentrationen der Kontrollen und Proben aus der erstellten Kalibrierkurve interpolieren. Die gefundenen Konzentrationen in den Proben mit dem Verdünnungsfaktor 10 (oder den tatsächlichen Verdünnungsfaktoren, falls eine weitere Verdünnung vorgenommen wurde) multiplizieren.
4. Die Kalibrierkurve und die Berechnung der Chromogranin-A-Konzentrationen in Proben und Kontrollen können auch mit einer Computermethode durchgeführt werden.

#### XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrierkurve verwendet werden.

Art des Röhrens	Durchschnittliche CPM	Berichtigte CPM	B/T %	B/B0 %
<b>Gesamtzahl der Zählungen</b>	22798			
<b>NSB</b>	494			
<b>Kalibrator 0 nmol/l</b>	8430	7936	35	100
<b>Kalibrator 0,156 nmol/l</b>	7171	6677	29	84
<b>Kalibrator 0,313 nmol/l</b>	6384	5830	26	73
<b>Kalibrator 0,625 nmol/L</b>	5468	4974	22	63
<b>Kalibrator 1,25 nmol/L</b>	4359	3865	17	49
<b>Kalibrator 2,50 nmol/L</b>	3318	2824	12	36
<b>Kalibrator 5,00 nmol/L</b>	2485	1991	9	25

#### XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN

##### A. Sensitivität

Die LoB (höchste Leerwertmessung) wurde durch 20-maliges Messen des Leerwerts berechnet und als die mittleren -2 Standardabweichungen der Verteilung der Testwerte ermittelt. Die LoB wurde mit 0,02 nmol/l berechnet. Die LoD (Detektionsschwelle) wurde als die LoB -1,65 Standardabweichungen einer Probe mit niedriger Konzentration berechnet,

die in 12 verschiedenen Durchläufen getestet wurde. Die LoD wurde mit 0,19 nmol/l berechnet.

Die LoQ (Quantifizierungsschwelle) wurde berechnet, indem 5 Proben von geringem Wert 12 Mal getestet wurden. Die LoQ wurde auf 1,9 nmol/l mit einem CV von 20 % berechnet.

##### B. Präzision

Die Intraassay-Präzision wurde bestimmt, indem 2 verschiedene Proben in 10 Wiederholungen auf einmal getestet wurden.

	1	2
<b>Mittelwert (nmol/l)</b>	3,12	9,63
<b>SD</b>	0,19	0,58
<b>% CV</b>	6,05	6,02

Die Interassay-Präzision wurde bestimmt, indem 2 verschiedene Proben in 10 Wiederholungen bei drei verschiedenen Gelegenheiten getestet wurden.

	1	2
<b>Mittelwert (nmol/l)</b>	3,47	9,80
<b>SD</b>	0,22	0,62
<b>% CV</b>	6,34	6,36

##### C. Spezifität

92 Serumproben von scheinbar gesunden Blutspendern wurden getestet, 87 von 92 waren negativ, mit Werten ≤ 3 nmol/l.

##### D. Rückverdünnung

Die Rückverdünnung wurde durch Testen von fünf Serienverdünnungen für drei verschiedene Proben bestimmt.

Probe	Verdünnung	Mittlere gemessene Konzentration (nmol/l)	Theoretische Konzentration (nmol/l)	Verdünnung Berichtigt % Wiederherstellung
1	1/1	23,4	23,4	100 %
	1/2	11,8	11,7	100,8 %
	1/4	5,7	5,85	97,4 %
	1/8	3,0	2,93	102,5 %
	1/16	1,7	1,46	116,2 %
Probe	Verdünnung	Mittlere gemessene Konzentration (nmol/l)	Theoretische Konzentration (nmol/l)	Verdünnung Berichtigt % Wiederherstellung
2	1/1	27,4	27,4	100 %
	1/2	14,6	13,7	106,5 %
	1/4	7,3	6,8	106,5 %
	1/8	3,0	3,4	87,6 %
Probe	Verdünnung	Mittlere gemessene Konzentration (nmol/l)	Theoretische Konzentration (nmol/l)	Verdünnung Berichtigt % Wiederherstellung
3	1/1	30,1	30,1	100 %
	1/2	12,4	15,0	82,3 %
	1/4	6,5	7,5	86,3 %
	1/8	3,5	3,7	93,0 %
	1/16	2	1,8	106,3 %

##### E. Interferenz

Proben, die Trübungen, Hämolyse, Hyperlipämie oder Fibrin enthalten, können zu ungenauen Ergebnissen führen.

#### XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Um es dem Labor zu ermöglichen, die konsistente Durchführung des Assays vollständig zu überwachen, sollten die folgenden wichtigen Faktoren überprüft werden.

### 1. Kontrollen

Die gefundenen Konzentrationen der Kontrollen sollten innerhalb der auf den Etiketten der Fläschchen angegebenen Grenzwerte liegen.

### 2. Gesamtzahl der Zählungen

Die erhaltenen Zählungen sollten sich dem erwarteten CPM annähern, wenn sie um die Gegenwirksamkeit und den radioaktiven Zerfall bereinigt werden. Der Gehalt an <sup>125</sup>I-Chromogranin A in diesem Kit ergibt eine Gesamtzählung im Assay (TOT) von 21.000 CPM (-10, + 20 %) zum Aktivitätsreferenzdatum (Zähleffizienz = 80 %).

### 3. Maximale Bindung (Bo/TOT)

Für jeden Assay die im Null-Kalibrator gebundene Radioaktivität in % berechnen:  
 $\frac{Bo}{TOT} \times 100$

### 4. Nicht spezifische Bindung (NSB/TOT)

Für jeden Assay die nicht-spezifische Bindung in % berechnen:

$$\frac{NSB}{TOT} \times 100$$

Der nicht-spezifische Anteil beträgt weniger als 6 %, wenn das Abgießen ordnungsgemäß durchgeführt wird.

### 5. Form der Kalibrierkurve

Die 80 %-, 50 %- und 20 %-Punkte der Kalibrierkurve z. B. auf Reproduzierbarkeit von Durchlauf zu Durchlauf überwachen.

## XV. REFERENZINTERVALLE

Referenzbereich, Serum:  $\leq 3.0$  nmol/l.

Der Referenzbereich wurde durch die Untersuchung von 92 Blutspendern festgelegt. Die Population besteht aus 49 männlichen und 43 weiblichen Personen im Alter von 18 bis 65 Jahren.

Das Intervall der gefundenen Werte liegt zwischen 5 und 95 Perzentilen: 1,6 bis 3,1 nmol/l. Der Mittelwert wird mit 2,15 nmol/l berechnet.

Es wird empfohlen, dass die Benutzer Referenzbereiche für die von ihren eigenen Labors bedienten Populationen festlegen.

### Nicht tumorbedingte Erhöhungen von Chromogranin A

Erhöhte Chromogranin-A-Spiegel können bei Patienten mit verminderter Nierenfunktion, Patienten mit atrophischer Gastritis und Patienten mit laufenden Behandlungen mit Protonenpumpenhemmern beobachtet werden.

## XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

### Sicherheit

Nur zur In-vitro-Diagnostik.

Da die Vorschriften von Land zu Land unterschiedlich sein können, ist es notwendig, dass die für das Labor verantwortliche Person mit den geltenden örtlichen Vorschriften in Bezug auf alle Aspekte radioaktiver Materialien der bei diesem Test verwendeten Art und Menge vertraut ist.

Dieses Kit enthält Mischungsbestandteile menschlichen Ursprungs. Sie wurden mittels Immunassay auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen, Antikörper gegen HCV und auf Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2 getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle empfohlenen Vorsichtsmaßnahmen für den Umgang mit Blutderivaten beachtet werden.

Dieses Kit enthält <sup>125</sup>I (Halbwertszeit: 60 Tage), die ionisierende X- (28 keV) und  $\gamma$ - (35,5 keV) Strahlen emittieren. Es sollten Maßnahmen ergriffen werden, um die ordnungsgemäße Handhabung des radioaktiven Materials gemäß den örtlichen und/oder nationalen Vorschriften sicherzustellen. Nur autorisiertes Personal sollte Zugang zu den Reagenzien haben.

Die folgenden Vorsichtsmaßnahmen sind beim Umgang mit radioaktiven Materialien zu beachten:

- Radioaktives Material sollte in speziell ausgewiesenen Bereichen gelagert werden, die normalerweise für unbefugtes Personal nicht zugänglich sind.
- Der Umgang mit radioaktivem Material sollte nur in genehmigten Bereichen durchgeführt werden.
- Es sollte darauf geachtet werden, dass Verschlucken und Kontakt mit Haut und Kleidung vermieden wird. Radioaktive Lösungen nicht mit dem Mund pipettieren.
- Bei der Verwendung von radioaktivem Material darf weder gegessen, getrunken oder geraucht werden
- Die Hände sollten durch Handschuhe geschützt und nach der Verwendung radioaktiver Materialien gewaschen werden.
- Die Arbeiten sollten auf einer Oberfläche durchgeführt werden, die mit absorbierendem Einwegmaterial bedeckt ist.
- Verschüttetes radioaktives Material sollte sofort entfernt und alle kontaminierten Materialien als radioaktiver Abfall entsorgt werden. Kontaminierte Oberflächen sollten mit einem Reinigungsmittel gereinigt werden.

Die Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid. Der Kontakt mit Kupfer- oder Bleiabflussrohren kann zur kumulativen Bildung von hochexplosiven Azidablagerungen führen. Bei der Entsorgung der Reagenzien im Abwasser stets

mit reichlich Wasser spülen, wodurch die Bildung von Metallazid verhindert wird. Rohrleitungen, bei denen der Verdacht besteht, dass sie mit diesen explosiven Ablagerungen kontaminiert sind, sollten gründlich mit 10%iger Natriumhydroxidlösung gespült werden.

## XVII. LITERATUR

1. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregini, E. and Bombardieri, E. Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours. Cancer 1999, 86:858-865.
2. Eriksson, B., Öberg, K. and Stridsberg, M. Tumour markers in neuroendocrine tumours. Digestion 2000, 62:33-38.
3. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. New England Journal of Medicine 1986, 314:1145-1151.
4. Stidsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K. Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments. Journal of Endocrinology 1993, 139:329-337.
5. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. Journal of Endocrinology 1995, 144:49-59.
6. Stridsberg, M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods. Advanced Experimental and Medical Biology 2000, 482:319-327.
7. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R. The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives. Neuroscience 1992, 49:497-528.
8. Jansson, A. M., Røsjø, H., Omland, T., Karlsson, T., Hartford, M., Flyvbjerg, A. and Caidahl, K. Prognostic value of circulating chromogranin A levels in acute coronary syndromes. European Heart Journal 2009, 30:25-32.

## XVIII.

### ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	Gesamtzahl	NSB	Kalibratoren (0-6)	Kontrollen	Proben
Kalibratoren	-	-	100 µl	-	-
Kontrollen	-	-	-	100 µl	-
Proben	-	-	-	-	100 µl
Testpuffer	-	100µl	-	-	-
<sup>125</sup> I-Tracer	100 µl				
Antiserum	-	-	100 µl		
Testpuffer	-	100µl	-		
Mit dem Vortexmischer durchmischen und 20-24 Stunden bei 2-8 °C inkubieren.					
Doppelte Antikörper-Festphase	-	500 µl			
Mit dem Vortexmischer durchmischen und 30-60 Minuten bei 2-8 °C inkubieren.					
15 Min. zentrifugieren (1700 g; 4 °C)					
Abgießen und Radioaktivität der Rückstände zählen					

DIAsource Katalognummer: KIPERB321	Revisionsnummer: 200618
---------------------------------------	----------------------------

Überarbeitungsdatum: 18/06/2020

Leggere integralmente il protocollo prima dell'uso.

# Chromogranin A-RIA

## I. DESTINAZIONE D'USO

Dosaggio radioimmunologico per la misurazione quantitativa *in vitro* della cromogranina A nel siero o nel plasma umano.

## II. INFORMAZIONI GENERALI

- A. **Nome brevettato :** DIASource RIA per cromogranina A
- B. **Numero di catalogo :** KIPERB321 : 100 test
- C. **Fabbricato da :** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Per assistenza tecnica o per informazioni sull'ordinazione, contattare:  
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

## III. RETROSCENA CLINICO

### 1. Attività biologiche

La cromogranina e la secretogranina sono una famiglia di proteine unicamente acide co-stoccate insieme a neurotrasmettitori e ormoni peptide diffuse nel cervello e nel sistema neuroendocrino (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). A livello strutturale, queste proteine sono prodotti di diversi geni ma condividono alcune proprietà generali, come l'abbondanza dei residui di amminoacidi e diverse parti di amminoacidi di base come potenziali posizioni per la scissione post-traduzionale. Le cromogranine sono co-stoccate e co-rilasciate con neuropeptidi e ormoni nelle cellule neuroendocrine nell'organismo. È stato suggerito un ruolo delle cromogranine nella generazione di granuli ormonali e pacchetti di ormoni. Inoltre, le cromogranine possono essere scisse in frammenti più piccoli che possono visualizzare le attività biologiche, come l'inibizione del rilascio ormonale, la vasodilatazione e gli effetti anti-microbologici.

I tumori di origine neuroendocrina solitamente si manifestano con un aumento di cromogranina A nel siero/plasma. I tumori neuroendocrini sono derivati dalle cellule neuroendocrine e i tumori neuroendocrini tipici sono tumori carcinoidi, feocromocitomi, neuroblastomi, cancro del polmone a piccole cellule, adenomi iperparatiroidismo, tumori della prostata, tumori dell'ipofisi e tumori all'isola pancreatica, comprese le sindromi MEN1 e MEN2. Tra questi vi sono anche diverse sindromi da tumori neuroendocrini, come i gastrinomi, gli insulinomi, i glucagonomi, i somatostatiniomi, i tumori secernenti il polipeptide pancreatico e i tumori neuroendocrini non secernenti (Eriksson, B. et al. 2000). Per questi tumori, la cromogranina A si è dimostrata essere il migliore marcatore circolante (Bajetta, E. et al. 1999).

Il primo dosaggio radioimmunologico per la misurazione della cromogranina A è stato introdotto nel 1986 (O'Connor, D.T. & Deftos, L.J. 1986). Da allora sono stati proposti altri test per la misurazione della cromogranina A umana intatta. Sono anche stati messi a punto test per la misurazione di regioni definite di cromogranina, come metodi specifici per la pancreastatina e per altre regioni della cromogranina A (Stridsberg, M. 2000).

L'attuale test per la cromogranina A è un metodo competitivo basato su anticorpi policlonali da coniglio. Sono stati prodotti anticorpi contro un frammento purificato contenente una sequenza di amminoacidi 116-439 nella molecola della cromogranina A.

### 2. Applicazione clinica

I tumori di origine neuroendocrina solitamente si presentano con livelli aumentati di cromogranina A nel siero/plasma. I tumori neuroendocrini derivano da cellule neuroendocrine.

I tumori neuroendocrini tipici sono tumori carcinoidi, feocromocitomi, neuroblastomi, cancro del polmone a piccole cellule, adenomi iperparatiroidismo, tumori dell'ipofisi, tumori della prostata e tumori all'isola pancreatica, comprese le sindromi MEN1 e MEN2. Tra questi sono incluse anche le sindromi tumorali neuroendocrine, ovvero i gastrinomi, gli insulinomi, i glucagonomi, i somatostatiniomi, i tumori secernenti il polipeptide pancreatico e i tumori neuroendocrini non secernenti.

#### IV. PRINCIPI DEL METODO

Il principio di base per la determinazione della cromogranina A con il kit RIA per cromogranina A di DIASource è un metodo competitivo radioimmunologico che utilizza anticorpi contro la cromogranina A umana.

La cromogranina A nei calibratori e campioni compete con la cromogranina A marcata <sup>125</sup>I nel legarsi agli anticorpi. La cromogranina A <sup>125</sup>I si lega agli anticorpi in proporzione inversa alla concentrazione di cromogranina A nei calibratori e nei campioni. La cromogranina A <sup>125</sup>I legata agli anticorpi viene separata dalla frazione non legata con la tecnica della precipitazione doppio anticorpo fase solida. La frazione di cromogranina A marcata <sup>125</sup>I viene misurata in un contatore Gamma. Per uso professionale in laboratorio.

#### V. REAGENTI FORNITI

Reagenti	Kit per 100 test	Codice colore	Ricostruzione		
<b>[ANTISERUM]</b> Antisiero di coniglio contro la cromogranina A umana (amminoacidi 116-439). L'antisiero è diluito e liofilizzato in tampone fosfato con albumina bovina, NaCl e Tween 20.	1 fiala liofilizzato	Blu	<b>Aggiungere 11 mL di acqua distillata</b>		
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>Ag</td><td><sup>125</sup>I</td></tr></table> TRACCIANTE: Cromogranina A marcata <sup>125</sup> I in tampone fosfato con albumina bovina, NaCl, NaN <sub>3</sub> e Tween 20.	Ag	<sup>125</sup> I	1 fiala liofilizzato 56 kBq	Rosso	<b>Aggiungere 12,5 mL di acqua distillata</b>
Ag	<sup>125</sup> I				
<b>[DASP]</b> Fase solida doppio anticorpo: Anti-Ig di coniglio coniugato con particelle in cellulosa nel tampone fosfato con albumina di siero bovino, NaCl, NaN <sub>3</sub> e Tween 20.	1 fiala 52 mL	Verde	<b>Pronto all'uso</b>		
<b>[ASS BUF]</b> Tampone del test : tampone fosfato contenente albumina di siero bovino, azoturo di sodio, NaCl e Tween 20. <b>Tampone usato per la diluizione di campioni, la preparazione di calibratori di lavoro e per sostituire l'antisiero in controlli con legame non specifico.</b>	1 fiala 50 mL	Nero	<b>Pronto all'uso</b>		
<b>[CAL]</b> Calibratore cromogranina A in tampone fosfato contenente albumina di siero bovino, azoturo di sodio (<0.1%), NaCl e Tween 20.	1 fiala liofilizzato	Giallo	<b>Ricostituire con acqua distillata in base al volume riportato sull'etichetta della fiala</b>		
<b>[CONTROL N]</b> Controlli - N = 1 o 2 Controlli liofilizzati con due diversi livelli di cromogranina A. <b>Le concentrazioni di cromogranina A sono riportate sulle etichette delle fiale.</b> I controlli non devono essere diluiti dopo la ricostituzione.	2 fiale liofilizzate	Argento	<b>Aggiungere 1 mL di acqua distillata</b>		

#### VI. NON IN DOTAZIONE

Il seguente materiale è necessario ma non fornito con il kit:

1. Acqua distillata.
2. Tubi del test usa e getta 11-13 x 55 mm, (polistirene).
3. Pipette con punte usa e getta, 50, 100 e 500 µL.
4. Pipette volumetriche 1.00 e 5.00 mL
5. Agitatore a vortice.
6. Centrifuga, refrigerata, almeno 1700 x g.
7. Contatore Gamma.

#### VII. PREPARAZIONE DEL REAGENTE

- A. Antisiero:** Ricostituire con 11 mL di acqua distillata. Conservare a 2-8° C.
- B. <sup>125</sup>I-cromogranina A :** Ricostituire con 12,5 mL di acqua distillata. Conservare a -20° C o a temperature inferiori se riutilizzato.
- C. Fase solida doppio anticorpo:** Pronto all'uso. Mescolare continuamente durante il pipettaggio con questo reagente. Conservare a 2-8° C.
- D. Tampone test:** Pronto all'uso. Conservare a 2-8° C.
- E. Calibratore cromogranina A:** Ricostituire con acqua distillata secondo il volume riportato sull'etichetta della fiala. Conservare a -20° C o a temperature inferiori se riutilizzato.
- F. Controlli :** Ricostituire ogni fiala con 1 mL di acqua distillata. Conservare a -20° C o a temperature inferiori se riutilizzato.

#### VIII. CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA DEI REAGENTI

Conservare tutti i reagenti a 2-8° C prima della ricostituzione e dell'uso. L'acqua usata per ricostituire i reagenti liofilizzati deve essere distillata in un apparecchio completamente in vetro oppure deve essere di purezza equivalente. Sciogliere i contenuti nelle fiale capovolgendoli delicatamente evitando che si formi schiuma.

La stabilità dei reagenti è riportata sulle etichette delle fiale.

Per i reagenti liofilizzati, la data di scadenza indicata si riferisce ai reagenti non ricostituiti.

I reagenti ricostituiti sono stabili per 12 settimane.

#### IX. RACCOLTA DI CAMPIONI

Il sangue venoso viene raccolto in provette senza additivi o in tubi contenenti eparina (144 U.S.P. Heparin in tubo da 10 mL), EDTA o litio. Raffreddare i campioni in un bagno di ghiaccio. Separare i campioni tramite centrifugazione a 2-4° C e conservarli a -20° C o temperature inferiori. I campioni devono essere congelati a -20° C entro tre ore dalla raccolta.

#### X. PROCEDURA

##### A. Note sulla manipolazione

Ricostituire i reagenti come specificato. I reagenti devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso.

È essenziale eseguire il pipettaggio con precisione. Tutti i test (calibratori, controlli e campioni) devono essere eseguiti in duplicati.

Un test completo comprende:

Calibratori: 7 diverse concentrazioni; 0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.50 e 5,00 nmol/L.

Controlli: basso e alto.

Campioni

Tubi per la determinazione del legame non specifico (tubi NSB)

Tubi per la determinazione della radioattività totale aggiunta (tubi TOT).

##### Diluire i campioni

I campioni devono essere diluiti in rapporto 1:10 con il tampone test prima del test.

I campioni con concentrazioni di cromogranina A superiori a 50 nmol/L possono essere ulteriormente diluiti con il tampone test e nuovamente testati.

##### B. Procedura

1. Ricostituire i reagenti liofilizzati seguendo le istruzioni e lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente.
2. Preparare i calibratori di lavoro della cromogranina A diluendo il calibratore per la cromogranina A 10.00 nmol/L con il tampone test secondo lo schema seguente:
  - a. 0.40 mL calibratore 10.00 nmol/L + 0.40 mL tampone test = 5.00 nmol/L
  - b. 0.40 mL calibratore 5.00 nmol/L + 0.40 mL tampone test = 2.50 nmol/L
  - c. 0.40 mL calibratore 2.50 nmol/L + 0.40 mL tampone test = 1.25 nmol/L
  - d. 0.40 mL calibratore 1.25 nmol/L + 0.40 mL tampone test = 0.625 nmol/L
  - e. 0.40 mL calibratore 0.625 nmol/L + 0.40 mL tampone test = 0.313 nmol/L
  - f. 0.40 mL calibratore 0.313 nmol/L + 0.40 mL tampone test = 0.156 nmol/L
  - g. tampone test = 0 nmol/L
3. Conservare i calibratori a -20° C o a temperature inferiori se riutilizzati.
3. Diluire i campioni 1:10 con tampone test ad es. con 50 µL campione e 450 µL tampone test. Miscelare nell'agitatore a vortice accuratamente.
4. Pipettare 100 µL di calibratori (0-5.00 nmol/L), controlli e campioni nei rispettivi tubi.
5. Pipettare 100 µL del calibratore zero (tampone test) nei tubi NSB.
6. Pipettare 100 µL <sup>125</sup>I-cromogranina A in tutti i tubi. I tubi TOT sono sigillati e tenuti da parte.
7. Pipettare 100 µL di antisiero in tutti i tubi eccetto i tubi NSB e i tubi TOT.
8. Pipettare 100 µL tampone test nei tubi NSB.
9. Miscelare nell'agitatore a vortice tutti i tubi accuratamente.

10. Lasciare incubare per 20-24 ore a 2-8°C.
11. Pipettare 500 µL doppio anticorpo fase solida in tutti i tubi eccetto i tubi TOT. Questo reagente deve essere mescolato continuamente con un agitatore magnetico durante il pipettaggio. Miscelare nell'agitatore a vortice accuratamente.
12. Lasciare incubare per 30-60 minuti a 2-8°C.
13. Centrifugare per 15 minuti a +4° C (minimo 1700 x g).
14. Decantare i surnatanti.
15. Misurare la radioattività dei pellet in tutti i tubi in un contatore gamma. Tempo di misurazione: 1-3 minuti.

La precisione intradosaggio è stata determinata testando 2 diversi campioni in 10 replicati in tre casi diversi.

	1	2
<b>Valore medio (nmol/L)</b>	3.47	9.80
<b>SD</b>	0.22	0.62
<b>% CV</b>	6.34	6.36

#### XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Sottrarre il conteggio medio (CPM) dei tubi NSB dal conteggio (CPM) di calibratori, controlli e campioni.
2. Generare una curva di calibrazione tracciando la frazione legata CPM o B/TOT rispetto alle concentrazioni di calibratori cromogranina A.
3. Interpolare le concentrazioni di cromogranina A nei controlli e campioni dalla curva di calibrazione generata. Moltiplicare le concentrazioni riscontrate nei campioni con il fattore di diluizione 10 (o l'effettivo valore di diluizione in caso di diluizioni ulteriori).
4. La curva di calibrazione e il calcolo delle concentrazioni di cromogranina A in campioni e controlli possono anche essere eseguiti con metodo computerizzato.

#### XII. DATI TIPICI

I seguenti dati hanno esclusivamente scopo dimostrativo e non devono mai essere utilizzati in luogo dell'effettiva curva di calibrazione temporale.

Tipo di tubo	CPM medio	CPM corretto	B/T %	B/B0 %
<b>Conteggi totali</b>	22798			
<b>NSB</b>	494			
<b>Calibratore 0 nmol/L</b>	8430	7936	35	100
<b>Calibratore 0.156 nmol/L</b>	7171	6677	29	84
<b>Calibratore 0.313 nmol/L</b>	6384	5830	26	73
<b>Calibratore 0.625 nmol/L</b>	5468	4974	22	63
<b>Calibratore 1.25 nmol/L</b>	4359	3865	17	49
<b>Calibratore 2.50 nmol/L</b>	3318	2824	12	36
<b>Calibratore 5.00 nmol/L</b>	2485	1991	9	25

#### XIII. ESECUZIONE E LIMITI

##### A. Sensibilità

Il LOB (limite di assenza) è stato calcolato misurando i vuoti 20 volte ed è stato calcolato come media -2 scarti quadratici standard della distribuzione dei valori del test. Il LOB calcolato è 0.02nmol/l.

Il LOD (limite di rilevamento) è stato calcolato come LOB -1.65 scarti quadratici standard di un campione a bassa concentrazione testato in 12 diverse fasi. Il LOD calcolato è 0.19nmol/l.

Il LOQ (limite di quantificazione) è stato calcolato testando 5 campioni di basso valore 12 volte. Il LOQ risultante è di 1.9nmol/l con CV del 20%.

##### B. Precisione

La precisione intradosaggio è stata determinata testando 2 diversi campioni in 10 replicati in un unico caso.

	1	2
<b>Valore medio (nmol/L)</b>	3.12	9.63
<b>SD</b>	0.19	0.58
<b>% CV</b>	6.05	6.02

##### C. Specificità

Sono stati testati 92 campioni di siero da donatori apparentemente sani, 87 su 92 sono risultati negativi, con valori ≤ 3 nmol/l.

##### D. Recupero di diluizione

Il recupero di diluizione è stato determinato testando cinque diluizioni seriali per tre campioni diversi.

Campione	Diluizione	Concentrazione media misurata (nmol/L)	Concentrazione teorica (nmol/L)	% recupero di diluizione corretta
1	1/1	23.4	23.4	100%
	1/2	11.8	11.7	100.8%
	1/4	5.7	5.85	97.4%
	1/8	3.0	2.93	102.5%
	1/16	1.7	1.46	116.2%
2	1/1	27.4	27.4	100%
	1/2	14.6	13.7	106.5%
	1/4	7.3	6.8	106.5%
	1/8	3.0	3.4	87.6%
	3	1/1	30.1	30.1
1/2		12.4	15.0	82.3%
1/4		6.5	7.5	86.3%
1/8		3.5	3.7	93.0%
1/16		2	1.8	106.3%

##### E. Interferenza

Campioni torbidi, con emolisi, iperlipemia o contenenti fibrina potrebbero dare risultati non precisi.

#### XIV. CONTROLLO INTERNO DI QUALITÀ

Per consentire al laboratorio di monitorare completamente le prestazioni del test, occorre verificare i seguenti importanti fattori.

##### 1. Controlli

La concentrazione di controlli rilevata deve essere compresa nell'intervallo dato sulle etichette delle fiale.

##### 2. Conteggi totali

I conteggi ottenuti dovrebbero avvicinarsi al CPM atteso CPM quando vengono regolati per l'efficienza del contatore e il decadimento radioattivo. Il contenuto di <sup>125</sup>I-cromogranina A in questo kit darà un conteggio totale nel test (TOT) di 21,000 CPM (-10, + 20%) alla data di riferimento attività (efficienza contatore = 80%).

##### 3. Legame massimo (Bo/TOT)

Calcolare per ogni test la % di radioattività legata nel calibratore zero:

$$\frac{Bo}{TOT} \times 100$$

TOT

#### 4. Legame non specifico (NSB/TOT)

Calcolare per ogni test la % di legame non specifico:

$$\frac{NSB}{TOT} \times 100$$

Il legame non specifico è inferiore al 6% se la decantazione è eseguita correttamente.

#### 5. Forma della curva di calibrazione

Per esempio, monitorare i punti a 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per la riproducibilità interfase.

#### XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Intervallo di riferimento, siero:  $\leq 3.0$  nmol/L.

L'intervallo di riferimento è stato impostato testando 92 donatori di sangue. A popolazione è composta da 49 uomini e 43 donne, di età compresa tra 18 e 65 anni. L'intervallo dei valori riscontrati da 5 a 95 percentili è: da 1.6 a 3.1 nmol/l. La mediana calcolata è 2.15 nmol/l.

Si raccomanda che gli utenti stabiliscano gli intervalli di riferimento per le popolazioni servite da propri laboratori.

#### Aumenti di cromogranina A non associati a tumore

Livelli maggiori di cromogranina A si possono osservare in pazienti con funzione renale ridotta, pazienti con gastrite atrofica e pazienti con terapie in corso con farmaci inibitori della pompa protonica.

#### XVI. PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

##### Sicurezza

Esclusivamente per la diagnostica in vitro.

Dato che le norme potrebbero variare da Paese a Paese, è fondamentale che la persona responsabile del laboratorio acquisisca dimestichezza con le norme locali in vigore relative a ogni aspetto dei materiali radioattivi del tipo e della quantità usati in questo test.

Questo kit contiene componenti di origine umana. Sono stati testati con il dosaggio immunologico per l'antigene superficiale dell'epatite B, anticorpi di HCV e anticorpi di HIV-1 e HIV-2 e trovati negativi. Ciononostante, seguire tutte le precauzioni raccomandate per la manipolazione dei derivati del sangue.

Questo kit contiene  $^{125}\text{I}$  (periodo di dimezzamento: 60 giorni), radiazioni emittenti ionizzanti X (28 keV) e  $\gamma$  (35.5 keV). Adottare misure volte a garantire la corretta manipolazione del materiale radioattivo secondo le norme locali e/o regionali. Soltanto il personale autorizzato deve avere accesso ai reagenti.

Rispettare le seguenti precauzioni quando si maneggiano materiali radioattivi:

- Il materiale radioattivo deve essere conservato in aree appositamente designate, non normalmente accessibili a personale non autorizzato.
- La manipolazione del materiale radioattivo deve essere effettuata soltanto nelle aree autorizzate.
- Prestare attenzione a prevenire l'ingestione e il contatto con pelle e abbigliamento. Non pipettare soluzioni radioattive per bocca.
- Deve essere vietato bere, mangiare o fumare dove viene usato materiale radioattivo.
- Le mani vanno protette con guanti e lavate dopo aver utilizzato materiale radioattivo.
- Eseguire il lavoro su una superficie coperta da materiale assorbente usa e getta.
- Eliminare immediatamente eventuali fuoriuscite di materiale radioattivo e gettare tutti i materiali contaminati come rifiuti radioattivi. Le superfici contaminate vanno pulite con detergente.

I reagenti in questo kit contengono azoturo di sodio. Il contatto con tubi di scarico di rame o piombo potrebbe provocare l'accumulo di depositi di azoturi altamente esplosivi. Quando si gettano i reagenti nella rete fognaria, sciacquare sempre con abbondante acqua per prevenire la formazione di sali metallici. I tubi sospetti di contaminazione con questi depositi esplosivi vanno sciacquati abbondantemente con una soluzione al 10% di idrossido di sodio.

#### XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregna, E. and Bombardieri, E. Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours. *Cancer* 1999, 86:858-865.
2. Eriksson, B., Öberg, K. and Stridsberg, M. Tumour markers in neuroendocrine tumours. *Digestion* 2000, 62:33-38.
3. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *New England Journal of Medicine* 1986, 314:1145-1151.

4. Stidsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K. Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments. *Journal of Endocrinology* 1993, 139:329-337.
5. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *Journal of Endocrinology* 1995, 144:49-59.
6. Stridsberg, M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods. *Advanced Experimental and Medical Biology* 2000, 482:319-327.
7. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R. The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992, 49:497-528.
8. Jansson, A. M., Røsjø, H., Omland, T., Karlsson, T., Hartford, M., Flyvbjerg, A. and Caidahl, K. Prognostic value of circulating chromogranin A levels in acute coronary syndromes. *European Heart Journal* 2009, 30:25-32.

#### XVIII. RIASSUNTO DEL PROTOCOLLO

	Conteggio totale	NSB	Calibratori (0-6)	Controlli	Campioni
Calibratori	-	-	100 µL	-	-
Controlli	-	-	-	100 µL	-
Campioni	-	-	-	-	100 µL
Tampone test	-	100µL	-	-	-
Tracciatore $^{125}\text{I}$	100 µL				
Antisiero	-	-	100 µL		
Tampone test	-	100µL	-		
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 20-24 ore a 2-8°C.					
Fase solida doppio anticorpo	-	500 µL			
Miscelare nell'agitatore a vortice e incubare per 30-60 min a 2-8°C.					
Centrifugare 15 min ( 1700 g; 4°C )					
Decantare e misurare la radioattività dei pellet					

Catalogo DIASource N°: KIPERB321	Revisione N° : 200618
-------------------------------------	--------------------------

Data revisione : 18/06/2020