

Testansatz

| |
|---|
| 1 Kugel |
| 10 µl Standards, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema pipettieren |
| 200 µl Assaypuffer |
| den Testansatz für über Nacht bei 4°C oder 2 h bei 37°C inkubieren |
| Waschen mit 2 * 4 ml (z.B. mit dem Immunowasher von Berthold) |
| 200 µl Tracer in alle Plastikröhrchen (12*75) pipettieren |
| den Testansatz 5 h bei Raumtemperatur oder 2 h bei 37°C inkubieren |
| Waschen mit 2 * 4 ml aqua dest. (z.B. mit dem Immunowasher von Berthold) |
| den Überstand dekantieren oder absaugen |
| die gebundene Aktivität im Luminometer 2 Sekunden zählen. |

Standards

Bei der Auswertung ist darauf zu achten, daß die folgenden Konzentrationen Verwendung finden:

| | | | | | |
|------------------------------|----------|-----------|------------|------------|------------|
| Standard | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Konzentration [µg/l]: | 0 | 75 | 150 | 300 | 600 |

Auswertung

Auswertung: Nach dem Zählen der gebundenen Aktivität werden die Ergebnisse der Probenkonzentrationen

- automatisch berechnet (Auswerteverfahren: Spline-Approximation, Four-Parameter -Logistik, Logit-log, o.ä.) und ausgedruckt oder
- manuell ausgewertet: Die Mittelwerte der Absorption der Doppelwerte berechnen. Konzentration der Standards (Abszisse) gegen die Lichtemission (Ordinate) auftragen. Für die Patientenproben werden die Werte an der Standardkurve abgelesen.

Validierung

Die mitbestimmten Kontrollen sollten im folgenden Vertrauensbereich liegen:

| | | |
|---------------------|----------|-----------------------|
| Kontrolle 1: | → | 125 - 175 µg/l |
| Kontrolle 2: | → | 200 - 400 µg/l |

Bestimmung Chromogranin A (CgA) im Serum mittels eines Immunochemoluminometrischen Nachweisverfahrens (ILMA).

Nur zu wissenschaftlichen Zwecken

Einführung

Chromogranin A (CgA) kommt in der chromaffinen Granula, also in Katecholamine-speichernden Vesikeln der Nebenniere vor. Es ist 68 kDa schwer und besteht aus 439 Aminosäuren mit einer Halbwertszeit von 18 Minuten bei Zirkulation im Körper. Die CgA-Konzentration spiegelt die exozytische, sympathoadrenale Aktivität und das Maß der Hormonausschüttung aus dem Nebennierenmark wider.

Ein weiterhin beobachtetes Vorkommen ist in neuroendokrinen Zellen, Phäochromozytomen, Karzinoiden und allen Tumoren, die Peptidhormone synthetisieren, z.B. Hyperparathyreoidismus, C-Zell-Karzinom, Inselzelltumor, Hypophysentumor, Bronchialkarzinom /kleinzelliges, Oat-Cell-Typ), endokrine Zellen des Darms (enteroendokrine Zellen).

Der hier entwickelte Test liefert mit einer **Sensitivität von 83 %** und einer **Spezifität von 96 %** ein sehr gutes diagnostisches Werkzeug zur Diagnose von

- **Phäochromocytome.**

Aber auch zur Abklärung der **Herkunft eines Tumors.**

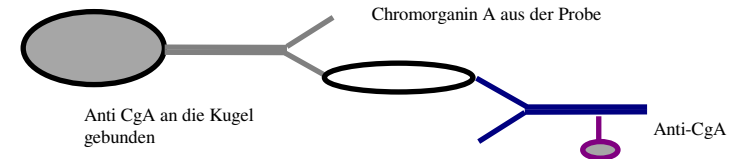
So weisen hohe Spiegel auf die Herkunft aus den neuroendokrinen Geweben hin.

Ein hoher CgA-Spiegel konnte auch bei Tumoren, die ihr Hormon nicht mehr bilden, z.B.

- **Calcitonin Negative, CgA-positive C-Zell-Karzinome,**
- **Null-Zell-Adenome der Hypophyse,**
- **Inselzellkarzinome des Pankreas und**
- **Nebenschilddrüsenkarzinome**

Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode

Anti CgA ist an eine Polystyrolkugel gebunden. Die zu bestimmenden Proben werden in die Vertiefungen zusammen mit einer Kugel pipettiert. Während der Inkubationszeit binden die spezifischen Antigen an den fixierten Antikörper. Ungebundenes Material wird weggesaugt und ein Akridiniumester gekoppelter Antikörper zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation mit nach folgendem Waschschriff wird die Lichtreaktion durch Zugabe von H₂O₂ und NaOH in einem Luminometer gestartet und die Lichtausbeute mit einem Photomultiplier detektiert. Die Lichtintensität ist proportional zu der Menge spezifischer Antikörper in den Röhrchen.



Assay Parameter

| | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Antigen an der Kugel: | Rabbit Anti-Chromogranin A |
| 2. Antikörper | Maus-Anti-human-Chromogranin A |
| Probenmaterial: | Serum |
| Probenvolumen | 10 µl |
| Sensitivität (untere Nachweisgrenze): | 1 µg/l |
| Spezifität (Kreuzreaktivität) | Spezifisch für humanes Chromogranin A |
| Intraassayvarianz: | <5,5 % |
| Interassayvarianz: | < 12,6 % |
| Meßbereich: | 25 - 200 µg/l |
| Normbereich | < 100 µg/l |
| Klinische Sensitivität | 83% |
| Klinische Spezifität | 96% |

Zusammensetzung der Testkits

| | Menge | Artikel |
|-----------------|------------|---|
| gebrauchsfertig | 100 Stk | 100 Kugeln (die mit polyklonalen Antikörpern beschichtet sind. In einem proteinhaltigen Lagerungspuffer) |
| gebrauchsfertig | 5 x 200 µl | 5 Standards (in wäßriger Lösung mit Natriumazid). |
| Gebrauchsfertig | 2 x 200 µl | Kontrollen Level 1 und 2 (in wäßriger Lösung mit Natriumazid.) |
| gebrauchsfertig | 21 ml | Tracer (Akridiniumester markierter monoklonaler Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Natriumazid) |
| gebrauchsfertig | 2 x 21 ml | Assaypuffer (Phosphatpuffer mit Natriumazid und Proteinzusatz pH 7,4) |

Aufbewahrung der Testkomponenten

Der gesamte Kit wird in tiefgefrorenem Zustand gelagert. Assaypuffer, Kugeln und Probenverdünnungspuffer können auch im Kühlschrank gelagert werden.

Probenmaterial und Probenhaltbarkeit

Die Haltbarkeit der Proben beträgt 5 Tage bei 4 °C oder 12 Monate in tiefgefrorenem Zustand.

Verwendete Geräte und Materialien

- 100 Einwegröhrchen (12*75 von Saarstedt)
- Probenständer und Ständer für Saarsredt-Röhrchen.
- Meßzylinder (500ml)
- 10 µl Pipette
- Multipette mit 5 ml und 50 ml Aufsatz
- Vortex-Mixer
- Luminometer
- Automatisches Waschgerät oder Handwaschgerät oder Wasserstrahlpumpe zum Absaugen der Lösung

Methodendurchführung

| | Vorbereitungen für die Methodendurchführung |
|----------|--|
| 1 | Verdünnungsmedium: Karzinompatienten weisen oft Werte über dem höchsten Standard auf. Zum genauen Bestimmen der Konzentration werden die Proben in Assaypuffer vorverdünt. |
| 2 | Kit-Komponenten und Probenmaterial auftauen: Die schonendste Möglichkeit besteht darin, den Kit, bzw. die Proben einen Tag vor Gebrauch vom Gefrierfach in den Kühlschrank zu stellen. |
| 3 | Kugeln vor Gebrauch mit entionisiertem Wasser waschen. |
| 4 | Die für den Testansatz benötigten Racks eindeutig beschriften. Verwendete Gefäße: Der Testansatz erfolgt in Plastikröhrchen (12*75) in speziellen Ständern |

Pipettierschema (für manuelles Pipettieren oder Pipettieren mit einem Probenverteilsystem)

| Stuhl rack-röhrchen-Nr. | | Volumen |
|-------------------------|-----------------|---------|
| 1, 2 | Standard 0 | 10 µl |
| 3, 4 | Standard 1 | 10 µl |
| 5, 6 | Standard 2 | 10 µl |
| 7, 8 | Standard 3 | 10 µl |
| 9, 10 | Standard 4 | 10 µl |
| 11,12 | Kontrolle I | 10 µl |
| 13, 14 | Kontrolle II | 10 µl |
| 15, 16 | Proben | 10 µl |
| alle 25 Proben | Kontrolle I, II | 10 µl |
| am Ende der Serie | Kontrolle I, II | 10 µl |

Allgemeine Hinweise

- Dieser Testkit und alle darin enthaltenen Komponenten dürfen nur zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt zur in vitro-Diagnostik verwendet werden.
- Alle mitgelieferten Testkomponenten enthalten Natriumazid. Bitte alle Sicherheitsmaßnahmen ergreifen. Die Berührung mit der Haut sollte vermieden werden.
- Es sollte unter keinen Umständen mit dem Mund pipettiert werden.
- Während der Testdurchführung Einmalhandschuhe tragen.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Kit-Chargen dürfen nicht verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinischen Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Der Hersteller übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller zu übersenden.
- Der Testkit ist nach Ablauf des auf die Packung aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.