



Cisbio Bioassays  
Parc Marcel Boiteux – BP 84175 – 30200 Codolet / França  
Telefone: + 33 (0) 4 66 79 67 00  
Fax: + 33 (0) 4 66 79 67 50  
E-mail: Cisbio.iva@revvity.com

REF **CGA-ELISA-NG**



[www.cisbio.com/ivd-pi](http://www.cisbio.com/ivd-pi)

## Instruções de utilização - PT



Referência do documento: 05 – março de 2024

### 1. NOME E UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O produto **CGA-ELISA-NG** é um kit para a deteção enzimática quantitativa de cromogranina A humana (chromogranin A, CGA) no soro ou plasma com EDTA em adultos.

O kit **CGA-ELISA-NG** destina-se a ser utilizado como auxiliar de diagnóstico na determinação da presença e progressão de neoplasias neuroendócrinas (NNE) do tipo GEP (Gastro-EnteroPancreáticas), em adultos.

O kit destina-se a utilização profissional e manual.

### 2. INTRODUÇÃO

A CGA é uma proteína hidrofílica e ácida de 439 aa (49 kD) presente nos grânulos de cromafina das células neuroendócrinas. Faz parte da família da granina. A CGA atua como uma pró-hormona. A sua proteólise é um componente fundamental da sua fisiologia. Esta degradação liberta peptídeos biologicamente ativos (vasostatina, cromostatina, pancreastatina, parastatina), que possuem diferentes funções parácrinas e autócrinas. Esta proteólise é específica do tecido e a fragmentação da proteína será diferente dependendo da sua localização. Esta ocorre principalmente na célula, dentro dos grânulos de cromafina. Em imuno-histoquímica, a presença de CGA nas células tumorais é sugestiva de uma origem neuroendócrina do tumor. A CGA circulante existe em participantes saudáveis e os valores obtidos são independentes da idade e sexo. A relevância da determinação de CGA em amostras de soro foi demonstrada para os cancros endócrinos, com elevações particularmente significativas nos tumores endócrinos gastro-entero-hepáticos. Estudos demonstraram que os níveis de CGA circulantes foram associados à diferenciação neuroendócrina e ligados à massa tumoral, sem, no entanto, substituir secreções mais específicas.

### 3. PRINCÍPIO

O kit CROMOGRANINA A é um imunoenensaio do tipo ELISA. Um primeiro anticorpo monoclonal, imobilizado na microplaca, captura as proteínas CGA contidas nos calibradores e amostras. Após a lavagem, as proteínas capturadas são então reconhecidas por um segundo anticorpo monoclonal conjugado com HRP [Horse-Radish-Peroxidase (peroxidase de rábano-silvestre)]. Após uma segunda incubação, os reagentes não ligados são eliminados por lavagem. Em seguida, a reação colorimétrica é iniciada pela adição de um substrato de HRP, TMB (3, 3', 5, 5' Tetrametil benzidina). Assim que a reação é interrompida, a densidade ótica (DO) de cada poço é lida a 450 nm. Os valores de DO medidos são proporcionais à concentração de CGA contida nos calibradores e amostras.

## 4. REAGENTES

Cada kit contém reagentes suficientes para 96 testes (incluindo a geração da curva de calibração). O prazo de validade está indicado no rótulo externo.

REAGENTES	SÍMBOLOS	QUANTIDADE	ARMAZENAMENTO
<b>MICROPLACA:</b> Pronto para utilização. Anticorpo monoclonal de ratinho anti-CGA fixado ao fundo do poço,  Albumina bovina.	<b>MICROPLATE</b>	1 placa com 96 poços	Antes de abrir: 2-8 °C até à data de validade.  Após abertura: as tiras não utilizadas poderão ser armazenadas por 6 semanas no saco plástico fornecido, com exsicante, devidamente lacrado, dentro dos limites do prazo de validade.
<b>CONJUGADO:</b> Pronto para utilização  Anticorpo monoclonal de ratinho anti-CGA acoplado à HRP,  Imunoglobulinas de ratinho não imunizadas, estabilizadores e conservantes.	<b>CONJ</b>	1 frasco para injetáveis 22 ml	Antes de abrir: 2-8 °C até à data de validade.  Após a abertura: o conjugado pode ser conservado a 2-8 °C durante um período de 6 semanas, dentro dos limites do prazo de validade.
<b>CALIBRADORES:</b> Liofilizado.  CGA recombinante humana, soro humano, EDTA, conservante.  75 – 140 – 300 – 600 – 1000 ng/ml *  Reconstitua com 0,25 ml de água destilada.	<b>CAL</b>	5 frascos	Antes de abrir: 2-8 °C até à data de validade.  Após reconstituição: não conservar por mais de uma hora à temperatura ambiente, dividir em alíquotas e congelar a - 20 °C por um período de 6 semanas, dentro dos limites do prazo de validade.
<b>CONTROLOS:</b> Liofilizado.  CGA recombinante humana, soro humano, EDTA, conservante.  90 – 720 ng/ml **  Reconstitua com 0,25 ml de água destilada.	<b>CONTROL</b>	2 frascos	Antes de abrir: 2-8 °C até à data de validade.  Após reconstituição: não conservar por mais de uma hora à temperatura ambiente, dividir em alíquotas e congelar a - 20 °C por um período de 6 semanas, dentro dos limites do prazo de validade.
<b>DIL/CAL0:</b> Pronto para utilização.  Este reagente é utilizado como tampão de incubação, diluente e calibrador0. Tampão, soro bovino, azida de sódio, EDTA.	<b>DIL CAL 0</b>	1 frasco para injetáveis 80 ml	Antes de abrir: 2-8 °C até à data de validade.  Após a abertura: o diluente/CAL0 pode ser conservado a 2-8 °C durante um período de 6 semanas, dentro dos limites do prazo de validade.
<b>TWEEN 20:</b> Solução de lavagem concentrada  Dilua 9 ml de Tween 20 em 3 l de água destilada. Agite suavemente.	<b>TWEEN 20</b>	1 frasco para injetáveis 10 ml	Antes de abrir: 2-8 °C até à data de validade.  Após a abertura: o Tween 20 pode ser conservado a 2-8 °C durante um período de 6 semanas, dentro dos limites do prazo de validade.
<b>SUBSTRATO:</b> Pronto para utilização  3, 3', 5, 5' Tetrametil benzidina: TMB	<b>SUBS TMB</b>	1 frasco para injetáveis 15 ml	Antes de abrir: 2-8 °C até à data de validade.  Após a abertura: a TMB pode ser conservada a 2-8 °C durante um período de 6 semanas, dentro dos limites do prazo de validade.
<b>SOLUÇÃO DE PARAGEM:</b> Pronto para utilização  Ácido sulfúrico 0,5 M.	<b>STOP SOLN</b>	1 frasco para injetáveis 22 ml	Antes de abrir: 2-8 °C até à data de validade.  Após a abertura: a solução de paragem pode ser conservada a 2-8 °C durante um período de 6 semanas, dentro dos limites do prazo de validade.
<b>PELÍCULA ADESIVA PARA MICROPLACA</b>		3	
<b>SACO DE PLÁSTICO</b>		1	

(\*Os valores indicados acima são apenas valores alvo, os valores reais são indicados nos rótulos dos frascos.

(\*\*) Os valores do limite de aceitação real estão indicados nos rótulos dos frascos.

## 5. PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

---

### 5.1. Medidas de segurança

- As matérias-primas de origem humana contidas nos reagentes deste kit foram testadas com kits licenciados e revelaram-se negativas para anticorpos anti-VIH 1, anti-VIH 2 e anti-VHC e antigénio HBs. No entanto, como é impossível garantir estritamente que tais produtos são incapazes de transmitir hepatite, o vírus HIV ou qualquer outra infeção viral, todas as matérias-primas de origem humana, incluindo as amostras a serem analisadas, devem ser tratadas como potencialmente infecciosas.
- Não pipete com a boca.
- Não fume, não coma nem beba em áreas onde as amostras ou os reagentes do kit sejam manuseados. Use luvas descartáveis ao manusear reagentes ou amostras do kit e lave bem as mãos depois. Evite salpicos.
- Descontamine e elimine as amostras e todos os materiais potencialmente contaminados como se contivessem agentes infecciosos. O melhor método de descontaminação é esterilizar em autoclave durante um mínimo de uma hora a 121,5 °C.
- A azida de sódio pode reagir com tubagens de chumbo ou cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas.
- Quando eliminar resíduos, dilua-os minuciosamente para evitar a formação de tais produtos.



CAL CONTROL CONJ

#### ADVERTÊNCIA

H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea

STOP SOLN

Não classificado como perigoso, mas solução com PH ácido

DIL CAL 0

Contém azida de sódio (<0,1%)

### 5.2. Precauções de manuseamento

- Não utilize os componentes do kit para além do seu prazo de validade.
- Não misture reagentes de lotes diferentes.
- Evite qualquer contaminação microbiana dos reagentes e da água. Cumpra os tempos de incubação.

## 6. COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

---

### 6.1 Pré-analítico

O ensaio é realizado diretamente em soro ou plasma com EDTA. Para um ensaio realizado no prazo de 4 horas, as amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente (18-25 °C). Para um ensaio realizado no prazo de 48 horas, as amostras devem ser armazenadas entre 2-8 °C após a colheita da amostra. Para um ensaio com mais de 48 horas, as amostras devem ser divididas em alíquotas que têm de ser armazenadas congeladas (-20 °C) até 10 meses.

**Diluição:** Se houver suspeita de níveis elevados de CGA, a diluição deve ser realizada utilizando o tampão diluente fornecido com o kit. Recomenda-se que as diluições sejam realizadas em tubos de plástico descartáveis.

### 6.2 Pré-diluição de amostras, controlos e calibradores (1/51)

- **Todas as amostras, os controlos e os calibradores têm de ser pré-diluídos 51 vezes** no diluente 

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

 0 fornecido no kit antes de serem testados. Misture suavemente a mistura utilizando um misturador Vórtex.

## 7. PROCEDIMENTO DE ENSAIO

### 7.1 Equipamento necessário

- Micropipetas de precisão ou equipamento semelhante com pontas descartáveis para distribuição de 20, 50, 100, 200 e 1000 µl. A calibração destes tem de ser verificada regularmente.
- Água destilada.
- Tubos de plástico descartáveis.
- Misturador vórtex.
- Lavador de microplacas (opcional).
- Agitador de microplacas.
- Leitor de microplacas, capaz de medir a absorvância a 450 nm. Como opção, o leitor pode ser equipado com um filtro capaz de ler a absorvância num comprimento de onda entre 610 nm e 650 nm (recomenda-se 620 nm). Esta segunda leitura permite corrigir as imperfeições da microplaca.

### 7.2 Protocolo

- Todos os reagentes têm de atingir a temperatura ambiente (18-25 °C) pelo menos 30 minutos antes da sua utilização. Os reagentes são pipetados e dispensados para os poços à temperatura ambiente (18-25 °C).
- Cada calibrador, controlo ou amostra tem de ser testado em duplicado.
- Reconstitua os frascos de calibradores e controlos. Verifique cuidadosamente se todo o produto liofilizado está dissolvido e utilize no prazo de uma hora após a reconstituição.

#### 7.2.1 Preparação da solução de lavagem **TWEEN 20**

- Para obter resultados fiáveis e reprodutíveis, recomenda-se que os passos de lavagem sejam realizados conforme indicado; o volume residual da solução de lavagem deve ser o mais baixo possível. Recomenda-se a utilização de um lavador de microplacas.
  - Para preparar a solução de lavagem, dilua 9 ml de Tween 20 **TWEEN 20** em 3 l de água destilada. Misture lentamente.

#### 7.2.2 Instruções - Seguir a ordem de adição de reagentes

*Consulte a última página para o cartão de protocolo do laboratório. É necessário ler na íntegra o folheto informativo detalhadamente antes de utilizar o cartão de protocolo do laboratório.*

1. Prepare e identifique um número suficiente de tubos de teste para realizar uma pré-diluição de amostras, calibradores e controlos
2. Determine o número de tiras de microtitulação necessárias para o ensaio. Retire as tiras não utilizadas do suporte da estrutura e guarde-as a 2-8 °C no saco adesivo, devidamente selado com um excicante.
3. **Pré-dilua os calibradores, amostras e controlos em tubos de plástico para 1:51**
  - a. Distribua 1 ml de diluente **DIL** **CAL** 0 nos tubos de plástico
  - b. Adicione 20 µl de cada calibrador, controlo ou amostra e misture suavemente com um misturador tipo vórtex
4. Distribua 200 µl de calibradores **CAL**, amostras ou controlos **CONTROL** pré-diluídos para 1/51 na DIL/CAL0 **DIL** **CAL** 0 em cada poço.
5. Cubra com a película adesiva, agite durante **1h a 700 rpm** à temperatura ambiente (**18-25 °C**).
6. Lave os poços da seguinte forma:
  - a. Remova o conteúdo dos poços
  - b. Distribua 300 µl de solução **TWEEN 20** de lavagem preparada conforme descrito no capítulo 7.2.1
  - c. Repita os passos a. e b. 2 vezes mais para um total de 3 ciclos de lavagem.
  - d. Termine aspirando. O volume residual da solução de lavagem deve ser o mais baixo possível. É possível bater suavemente na placa ao contrário para remover o líquido residual.
7. Distribua **200 µl** de conjugado **CONJ** HRP em todos os poços.
8. Cubra com a película adesiva e **incube durante 2h +/- 5'** à temperatura ambiente (18-25 °C) sob **agitação a 700 rpm**.

9. Lave os poços conforme indicado acima e, em seguida:
10. Distribua 100 µl de TMB SUBS TMB em todos os poços. Cubra com a película adesiva. Não é necessária incubação no escuro.
11. Deixe a reação colorimétrica desenvolver-se **durante exatamente 10 min** à temperatura ambiente (18-25 °C), **sob agitação (700 rpm)**.
12. Pare a reação adicionando 50 µl de solução STOP SOLN de paragem a todos os poços.
  - Leia a absorvância a 450 nm. Realize uma segunda leitura (opcional) da absorvância a comprimento de onda entre 610 nm e 650 nm.

## 8. CONTROLO DE QUALIDADE

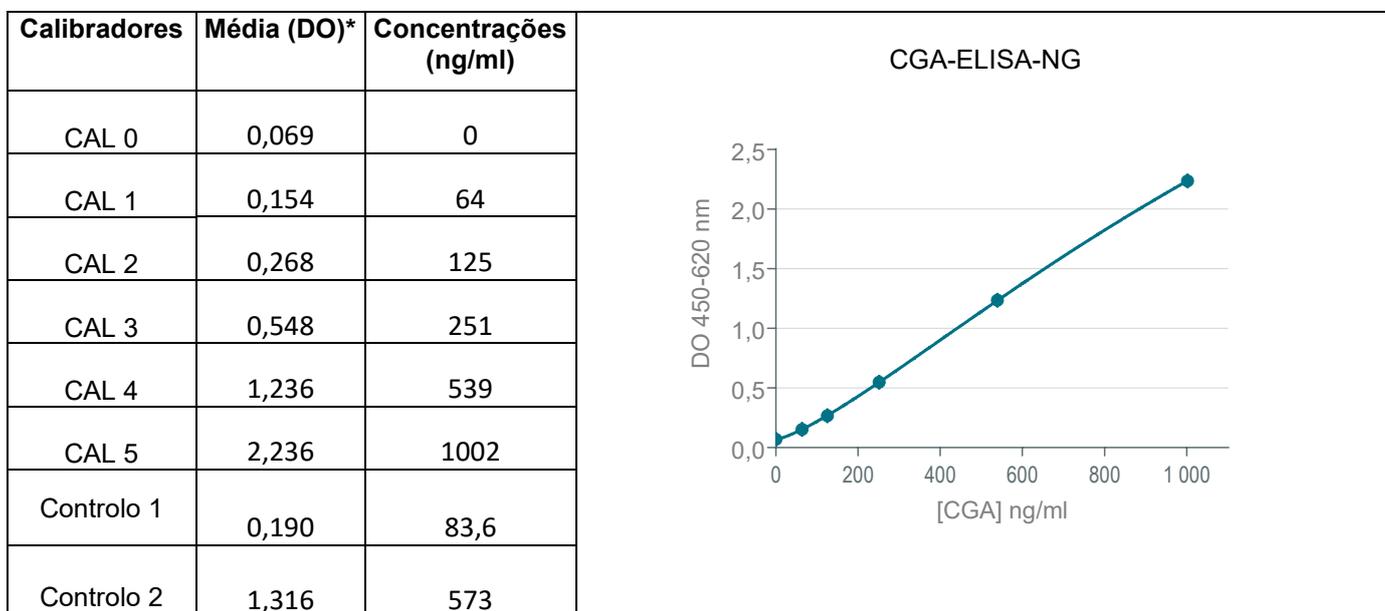
As Boas Práticas Laboratoriais (BPL) exigem que as amostras de controlo de qualidade sejam utilizadas em cada série de ensaios para verificar a qualidade dos resultados obtidos. Todas as amostras devem ser tratadas de forma idêntica e recomenda-se a análise dos resultados utilizando os métodos estatísticos adequados.

## 9. RESULTADOS

1. Correção opcional da DO\*: subtraia leituras a 620 nm das leituras a 450 nm.
2. Para cada duplicado, calcule a absorvância média (DO) dos calibradores, controlos e amostras.
3. Crie uma curva de calibração traçando os valores de DO médios (corrigidos\*) a 450 nm dos calibradores (eixo y) em relação à sua concentração (eixo x) indicada no frasco.
4. Recomenda-se o modelo de ajuste matemático logístico com quatro parâmetros 4PL com peso  $1/y^2$ , para as curvas de calibração. Outras funções de redução de dados podem dar resultados ligeiramente diferentes.

Leia a concentração das amostras da curva. A razão de pré-diluição de 1:51 já foi calculada nas concentrações do calibrador.

*Exemplo de dados de ensaio: apenas a título ilustrativo e não pode, em circunstância alguma, ser substituído por resultados obtidos no laboratório.*



## 10. LIMITAÇÃO DO PROCEDIMENTO

- As amostras que apresentem turvação, hemólise, hiperlipemia ou que contenham fibrina podem produzir resultados imprecisos.
- Não extrapolar os valores da amostra para além do último padrão. Dilua as amostras de concentrações elevadas e volte a testar.
- Não utilize o kit CGA-ELISA-NG para a determinação de CGA circulante em doentes com tratamentos em curso com base em fármacos inibitórios da bomba de prótons ou em doentes com função renal diminuída ou com gastrite atrófica. Estes doentes têm níveis fisiologicamente elevados de CGA circulante não ligados à presença de um tumor neuroendócrino.
- Não interprete os resultados em doentes sob terapêutica com análogos de somatostatina, estes doentes podem apresentar resultados falsamente baixos.

## 11. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### 11.1 Imprecisão

Amostras	n	Concentração Média (ng/ml)	Intra série (CV%)
1	34	81,6	6,43
2	36	122	4,68
3	31	182	4,13
4	35	407	3,19
5	36	445	3,98
6	35	632	4,73

Amostras	n	Concentração Média (ng/ml)	Inter séries (CV%)
1	28	51,3	11,5
2	28	187	6,4
3	28	442	6,8
4	20	697	7,0

### 11.2 Teste de recuperação

Foram adicionadas quantidades conhecidas de CGA aos soros humanos. As percentagens de recuperação nas amostras variaram entre 90 e 110%.

### 11.3 Teste de diluição

Foram diluídas amostras com concentrações elevadas. As percentagens de recuperação obtidas situaram-se entre 80% e 120%.

### 11.4 Especificidade

Não foi observada interferência quando as amostras de soro foram testadas com qualquer uma das seguintes substâncias:

- Glucagão (até 3000 ng/ml)
- Gastrina (até 3000 ng/ml)
- Cromogranina B (até 3000 ng/ml)
- NSE (até 3000 ng/ml)
- Polipéptido pancreático (até 3000 ng/ml)

### 11.5 Intervalo de medição

As amostras devem ser medidas no intervalo entre o limite de quantificação e a concentração mais elevada do intervalo de calibração, ou seja, entre 30,6 e 1000 ng/ml.

### 11.6 Limite de deteção

O limite de deteção (LOD ou sensibilidade analítica) do kit CGA-ELISA-NG é definido como sendo a concentração detetável mais baixa que difere de zero com uma probabilidade de 95% calculada adicionando 2 desvios padrão ao valor médio de 30 análises replicadas do calibrador zero (CAL0). Foi medido a 16,9 ng/ml.

A sensibilidade funcional é definida como sendo a concentração medida pelo perfil de imprecisão num CV igual a 20%. Estima-se que seja de 30,6 ng/ml.

### 11.7. Efeito de gancho

Não há efeito de gancho até 1.000.000 ng/ml.

## 11.8. Interferência

- Quando é seguido o protocolo de ensaio fornecido nas instruções de utilização, não é medida qualquer interferência com a biotina para uma concentração entre 0 e 600 ng/ml.
- NOTA: Os resultados demonstraram que uma concentração de biotina a 1200 ng/ml causou uma ligeira interferência (-14% de enviesamento máximo) com o kit CGA-ELISA-NG.
- Não foi observada interferência com **bilirrubina e hemoglobina** medidas até às respetivas concentrações de 0,15 mg/ml, 2 mg/ml.
- Não foi observada interferência quando as amostras de soro foram suplementadas com triglicéridos provenientes de amostras humanas hiperlipidémicas e testadas (TG total de 743,4 mg/dl).

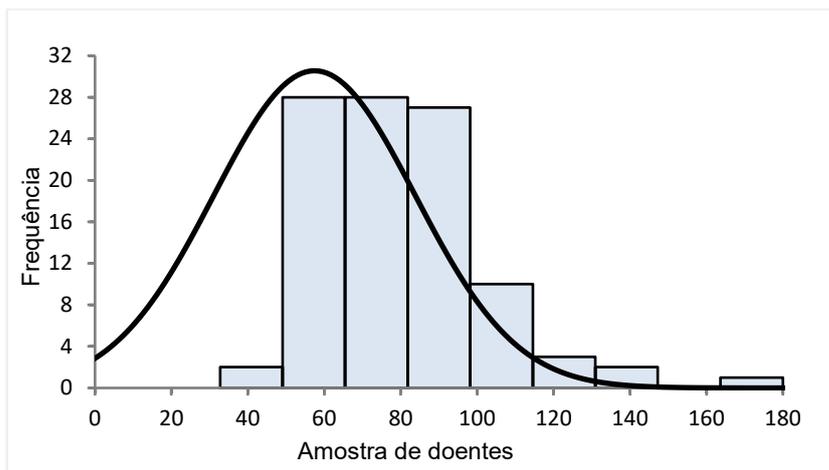
**ATENÇÃO:** O imunoensaio está protegido contra potenciais interferências com **anticorpos heterofílicos**, tais como HAMA e fatores reumatóides (RF) através da adição de uma proteção (imunoglobulinas de rato não específicas). No entanto, não podemos garantir que nunca haverá qualquer resultado falso positivo ou negativo devido à presença de anticorpos heterofílicos e fatores reumatóides em amostras de doentes.

## 12. VALORES NORMAIS ESPERADOS

Recomenda-se que cada laboratório determine o seu próprio intervalo de valores normais, dependendo do tipo de amostra habitualmente utilizada. A cromogranina A é uma proteína de ligação ao cálcio e os seus níveis circulantes são afetados pela concentração de Ca<sup>++</sup>. Os valores humanos normais encontrados podem diferir, dependendo se são analisados os soros colhidos em tubos de colheita de sangue seco ou plasmas com EDTA.

Os valores apresentados abaixo são apresentados apenas como indicação e foram obtidos em amostras de soro com uma população de 101 indivíduos presumivelmente saudáveis.

Para os valores normais de distribuição apresentados abaixo, o percentil 95 está localizado em 101 ng/ml.



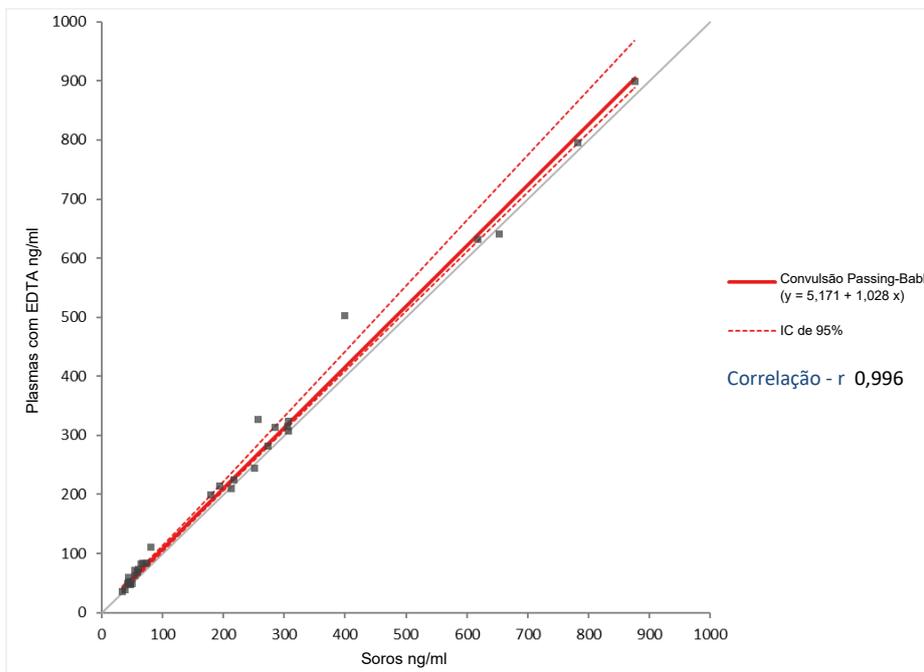
### Valores normais em amostras de plasma com EDTA:

A correlação soro/plasma apresentada abaixo tem de ser utilizada para determinar a concentração plasmática de CGA.

A equação da correlação é a seguinte:

$$[\text{Amostra de plasma}] = 1,028 \times [\text{Amostra de soro}] + 5,171$$

Para extrapolar os valores em plasma com EDTA, esta equação deve ser aplicada aos valores normais encontrados nas amostras de soro,



## 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**

*Postępy 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

Hijjoka 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.

**CARTÃO DE PROTOCOLO DO LABORATÓRIO**

Não utilize este cartão sem ter lido todo o folheto informativo.

👉 **Pré-dilua os calibradores, amostras e controlos em tubos de plástico para 1:51.**

Pré-diluição 1:51

**1. DISTRIBUA** 1 ml de diluente nos tubos de plástico

DIL CAL 0

**2. ADICIONE** 20 µl de cada calibrador, controlo ou amostra e misture suavemente com um misturador tipo vórtex

CAL CONTROL

**3. DISTRIBUA AS AMOSTRAS NA MICROPLACA**

CAL CONTROL

↓ Distribua 200 µl de **calibradores, amostras ou controlos pré-diluídos para 1/51** na DIL/CAL0 em cada poço (Distribuição em duplicado).

+ 200 µl



**4. AGITAÇÃO**

↓ Cubra com a película adesiva, **agite durante 1h a 700 rpm** à temperatura ambiente (18-25 °C).

↻ 700 rpm 1 h



**5. LAVAR OS POÇOS** (ver § 7.2.1)

TWEEN 20

Prepare a solução de lavagem por diluição de 9 ml de Tween 20 em 3 l de água destilada. Remova o conteúdo dos poços.

Distribua 300 µl de solução de lavagem preparada em cada poço

Repita os passos 2 vezes mais para um total de 3 ciclos de lavagem

Termine aspirando. O volume residual da solução de lavagem deve ser o mais baixo possível. É possível bater suavemente na placa ao contrário para remover o líquido residual.

3 x 300 µl



**6. DISTRIBUIR O CONJUGADO**

CONJ

Distribua 200 µl de conjugado HRP em todos os poços

+ 200 µl



**7. INCUBAR**

Cubra com a película adesiva e incube durante **2h +/-5'** à temperatura ambiente (18-25 °C) **sob agitação a 700 rpm.**

↻ 700 rpm 2h +/-5'



**8. LAVAR OS POÇOS** (ver § 7.2.1)

TWEEN 20

Prepare a solução de lavagem por diluição de 9 ml de Tween 20 em 3 l de água destilada. Remova o conteúdo dos poços.

Distribua 300 µl de solução de lavagem preparada em cada poço.

Repita os passos 2 vezes mais para um total de 3 ciclos de lavagem.

Termine aspirando. O volume residual da solução de lavagem deve ser o mais baixo possível. É possível bater suavemente na placa ao contrário para remover o líquido residual.

3 x 300 µl



**9. DISTRIBUIR O SUBSTRATO**

SUBS TMB

↓ Distribua 100 µl de TMB em todos os poços. Cubra com a película adesiva. Não é necessária incubação no escuro.

Deixe a reação colorimétrica desenvolver-se **durante exatamente 10 min** à temperatura ambiente (18-25 °C), **sob agitação a 700 rpm**

+ 100 µl



↻ 700 rpm

10 min



**10. DISTRIBUIR A SOLUÇÃO DE PARAGEM**

STOP SOLN

↓ Pare a reação adicionando 50 µl de solução de paragem a todos os poços.

+ 50 µl



**11. LEITURA**

🏠 Leia a absorvância a **450 nm**. Realize uma segunda leitura (opcional) da absorvância a comprimento de onda de 620 nm (entre 610 nm e 650 nm).

Utilize uma convulsão **logística equilibrada de 4 parâmetros** para interpolação de dados.

450 nm



FRA

**Modifications par rapport à la version précédente :**

Nouveau logo Revvity; mise à jour de l'adresse email de l'assistance "in vitro"

ENG

**Changes from the previous version:**

New Revvity logo; update of the IVA email address.

DEU

**Änderungen gegenüber der Vorgängerversion:**

Neues Revvity-Logo; aktualisierte E-Mail-Adresse für "In-vitro"-Support

ITA

**Modifiche rispetto alla versione precedente:**

Nuovo logo Revvity; aggiornamento dell'indirizzo e-mail del supporto in vitro

SPA

**Cambios desde la versión anterior:**

Nuevo logotipo de Revvity; dirección de correo electrónico de asistencia in vitro actualizada

HUN

**Változások az előző verzióhoz képest:**

Új Revvity logó; frissített in vitro támogatási e-mail cím

CES

**Změny od předchozí verze:**

Nové logo Revvity; aktualizovaná e-mailová adresa podpory in vitro

POR

**Alterações em relação à versão anterior:**

Novo logótipo Revvity; endereço de correio eletrónico de apoio in vitro atualizado

	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 hőmérséklet határ	Mezní teplota skladování	Limite da temperatura de armazenagem
<b>LOT</b>	Code du lot	Batch code	Chargencode	codice lotto	Código de lote	Gyártási szám	Č. šarže	Lote
	Utiliser jusqu'au	Use by	Verwendbar bis	utilizzare entro	Fecha de caducidad	Felhasználható az alábbi dátumig :	Použitelné do	Utilizado por
	Consulter la notice d'utilisation	Consult instructions for use	Das Handbuch zu Rate ziehen	Consultare le istruzioni per l'uso	Consúltense las instrucciones de uso	Olvassa el a használati utasítást	Přečtěte si návod k použití	Consulte o manual de operações
<b>IVD</b>	Dispositif médical de diagnostic in vitro	In vitro medical device	In-VitroDiagnostische Anwendung	Dispositivo Diagnostico In Vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro	In vitro diagnosztika	Diagnostika in vitro	Dispositivo de diagnóstico In Vitro
	Fabricant	Manufacturer	Hersteller	Fabbricante	Fabricante	Gyártó	Vyrobil	Fabricado por
<b>REF</b>	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
<b>CONJ</b>	Conjugué	Conjugate	Komplex	Coniugato	Conjugado	Kétfázisú elegy	Konjugát	Conjugado
<b>CAL</b>	Calibrateur	Calibrator	Kalibrator	Calibratore	Calibrador	Kalibrátor	Kalibrátor	Calibrador
<b>CONTROL</b>	Contrôle	Control	Kontrolle	Controllo	Control	Kontroll	Kontrola	Controle
<b>TWEEN 20</b>	Solution concentrée	Concentrated solution	Konzentrierte Lösung	Soluzione concentrata	Solución concentrada	Koncentrált oldat	Koncentrovaný roztok	Solução concentrada
<b>MICROPLATE</b>	Microplaque	Microplate	Mikrotiterplatte	Micropiastra	Microplaca	mikrolemez	Mikrotitrační destička	Microplaca
<b>DIL</b> <b>CAL</b>	Diluant	Diluent	Verdünnungsmittel	Diluyente	Diluyente	Hígítószer	ředidlo	Diluyente
<b>SUBS</b> <b>TMB</b>	Substrat	Substrate	Substrat	Sustrato	Substrato	Szubsztrátum	Substrát	Substrato
<b>STOP</b> <b>SOLN</b>	Solution d'arrêt	Stop solution	Stopplösung	Soluzione d'arresto	Solución de parada	Semlegesítő oldat	Zastavovací roztok	Solução de paragem