

Instructions for Use

NSE ELISA

IVD



REF EIA-4610

 96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE	2
2	PRINCIPLE	2
3	REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION.....	2
4	WARNINGS	3
5	PRECAUTIONS	3
6	PROCEDURE	4
7	QUALITY CONTROL	5
8	RESULTS	5
9	REFERENCE VALUES.....	6
10	PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS	6
11	WASTE MANAGEMENT	6
1	VERWENDUNGSZWECK	7
2	TESTPRINZIP.....	7
3	REAGENZIE, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG	7
4	WARNHINWEISE	8
5	VORSICHTSMASSNAHMEN	8
6	TESTDURCHFÜHRUNG	9
7	QUALITÄTSKONTROLLE	10
8	ERGEBNISSE.....	10
9	REFERENZWERTE.....	11
10	TESTCHARAKTERISTIKA	11
11	ENTSORGUNG	11
1	DESTINAZIONE D'USO	12
2	PRINCIPIO DEL METODO.....	12
3	REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE	12
4	AVVERTENZE	13
5	PRECAUZIONI	13
6	PROCEDIMENTO.....	14
7	CONTROLLO QUALITA'	15
8	RISULTATI.....	15
9	VALORI DI RIFERIMENTO	16
10	PARAMETRI CARATTERISTICI	16
11	DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO.....	16
1	USO PREVISTO	17
2	PRINCIPIO DEL MÉTODO.....	17
3	REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN.....	17
4	ADVERTENCIAS	18
5	PRECAUCIONES	18
6	PROCEDIMIENTO.....	19
7	CONTROL DE CALIDAD.....	20
8	RESULTADOS.....	20
9	VALORES DE REFERENCIA.....	21
10	PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS.....	21
11	DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN.....	21
12	BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA.....	22
	SYMBOLS USED.....	23

1 INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of hNSE concentration in human serum. NSE ELISA kit is intended for laboratory use only.

1.1 Clinical Significance

Neuron Specific Enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase) is an isoenzyme that belongs to the enolase family (homo- and heterodimer constituted of α , β and γ subunit) that is distinguished from these by the presence of the specific $\gamma\gamma$ heterodimer.

The clinical usefulness of hNSE like tumor marker is compared to non small cell lung cancer (NSCLC), to neuroblastoma, to medullary carcinoma of the thyroid, pancreatic islet cell tumor and to non neoplastic condition of neuronal disease and cerebral trauma.

The NSE ELISA test cannot be used as a screening test for neuroendocrine tumors, but may be used to follow levels in established diagnosis.

2 PRINCIPLE

The NSE ELISA test is based on simultaneous binding of human Neuron Specific Enolase by two monoclonal antibodies, one immobilized on microwell plates and the other conjugates with horseradish peroxidase (HRP).

After incubation the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing, then the TMB-Substrate solution (TMB) is added. After an appropriate time has elapsed for maximum colour development, the enzyme reaction is stopped and the absorbancies are determined.

The colour intensity is proportional to the hNSE concentration in the sample.

hNSE concentration in the sample is calculated based on a Calibration curve.

3 REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

1.2 Reagents and materials supplied in the kit

1. **Standards (CAL 0 - CAL4)**, 2 vials each Calibrator, lyophilized;
please read carefully paragraph 6.1
2. **Controls**, 2 vials each, lyophilized
Negative and Positive Control
please read carefully paragraph 6.1
3. **Incubation Buffer**, 1 vial, 50 mL,
Phosphate buffer 50 mM, pH 7.4, BSA (1 g/L)
4. **Conjugate**, 1 vial, 1 mL,
Monoclonal anti hNSE antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
5. **Microplate**, 1 breakable microplate,
Monoclonal anti hNSE antibody adsorbed on the microplate
6. **TMB-Substrate**, 1 vial, 15 mL,
H₂O₂-TMB 0.26g/L, (avoid any skin contact)
7. **Stop Solution**, 1 vial, 15 mL,
Sulphuric acid 0.15 mol/L, (avoid any skin contact)
8. **Wash Solution 50X** concentrate, 1 vial, 20 mL
NaCl (45 g/L); Tween 20 (55 g/L)

1.3 Necessary reagents not supplied

Distilled water.

1.4 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

The Calibrators and Controls contain hNSE in a proteic stabilizing matrix solution.

Store all reagents between 2 °C - 8 °C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, the plate is stable up to expiry date.

4 WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300 as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of hNSE inside the range of CAL 0 - CAL 4.
Calibrator values are lot-specific.

5 PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction for Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2 °C - 8 °C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 °C - 28 °C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipaemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6 PROCEDURE

6.1 Preparation of Standards and Controls

Reconstitute each vial of Standard and Control with 0.75 mL of deionized H₂O before use.

Important note: Reconstituted Standards and Controls are very sensitive to temperature, so you should proceed as follows:

1. Reconstitute each vial of Standard and Control with 0.75 mL of deionized water
2. Leave on a rolling mixer for about 5 minutes
3. Take the necessary aliquot for the assay and **immediately** aliquot and freeze at -20 °C unused Standards and Controls.

Reconstituted Standards and Controls are stable 1 month at -20 °C; avoid repeated freezing and thawing.

The Calibrators have **approximately** the following concentrations:

	CAL 0	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4
ng/mL	0	4	20	50	100

The right Standard concentrations for the curve compute are lot specific and are stated on the Standard vial labels and on the Certificate of Analysis.

6.2 Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 20 µL of Conjugate (reagent 4) to 1 mL of Incubation Buffer (reagent 3), the quantity to prepare is directly proportional to the number of test.

Mix gently leaving in a rotating shaker for at least 5 minutes.

6.3 Preparation of Wash Solution

Dilute contents of wash buffer concentrate (50X) to 1000 mL with distilled or deionised water in a suitable storage container.

For smaller volumes respect the dilution ratio of 1:50.

The diluted buffer is stable at 2 °C - 8 °C for at least 30 days.

6.4 Preparation of the Sample

The hNSE determination can be carried out in human serum.

The serum would have to be separated from the blood within 60 minutes in order to avoid the increment of the hNSE from the blood cells release.

Do not use hemolyzed samples.

Avoid use of plasma since meaningful amounts of hNSE could be yielded from platelets.

Samples can be stored at 2 °C - 8 °C for 1 day; for long periods store at -20 °C.

Avoid repeated freeze-thaw cycles. Do not allow the samples at room temperature for long period.

6.5 Procedure

Allow all reagents to reach room temperature (22 °C - 28 °C) for at least 30 minutes.

At the end of the assay, store immediately the reagents at 2 °C - 8 °C avoid long exposure to room temperature (see paragraph 6.1 for Calibrators and Controls).

Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 °C - 8 °C.

To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.

As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (CAL 0 - CAL 4), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
CAL 0 - CAL 4	25 µL		
Sample/ Controls		25 µL	
Diluted Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22 °C - 28 °C) for 1 hour. Remove the contents from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. <u>Important note:</u> during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. <u>Automatic washer:</u> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22 °C - 28 °C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620 - 630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7 QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of hNSE for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8 RESULTS

8.1 Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbancies (Em) corresponding to the single points of the calibration curve (CAL 0 - CAL 4) and of each sample.

8.2 Calibration curve

Plot the values of absorbance (Em) of the Calibrators (CAL 0 - CAL 4) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (e.g.: Cubic Spline, Sigmoid Logistic or Four Parameter Logistic).

8.3 Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/mL.

9 REFERENCE VALUES

The serum values are comprised in the following intervals:

	hNSE
Normal range	0 - 12 ng/mL
Pathological value	> 12 ng/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation.

Therefore each laboratory should consider the range given by the manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10 PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1 Specificity

The antibody is directed specifically against the human neuron specific enolase.

Cross reactivity values have been calculated on a weight/weight basis.

NSE Fitzgerald (Cat.No.30AN10 Lot. A99052602)	100%
NNE Biogenesis (Cat. 6880-1004 Lot. 991105A)	<0.22%

10.2 Sensitivity

The lowest detectable concentration of hNSE that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.19 ng/mL at the 95 % confidence limit.

10.3 Precision

10.3.1 Intra-assay

Within run variation was determined by replicate measurements (16x) of two different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 4.4\%$.

10.3.2 Inter-assay

Between run variation was determined by replicate measurements (10x) of two different control sera in different lots. The between assay variability is $\leq 11.2\%$.

10.4 Correlation

The NSE ELISA (EIA-4610) kit was compared to another commercially available hNSE assay (EIA-2353). 28 serum samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve is:

$$(EIA-2353) = 1.34 \times (EIA-4610) - 0.66$$

$$r^2 = 0.971$$

10.5 Hook Effect

This NSE ELISA kit shows no Hook Effect up to 5000 ng/mL of hNSE.

11 WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

1 VERWENDUNGSZWECK

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von NSE in humanem Serum.

Der NSE ELISA ist nur für Laborzwecke bestimmt.

1.1 Klinische Bedeutung

Daten hierzu entnehmen Sie bitte der englischen Version.

2 TESTPRINZIP

Der NSE ELISA basiert auf der gleichzeitigen Bindung von humanem NSE an zwei monoklonale Antikörper, von denen der eine auf der Mikrotiterplatte fixiert und der andere mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist.

Nach der Inkubation werden gebundenes und freies Antigen durch einfach durchzuführendes Waschen der festen Phase getrennt, dann wird die Substratlösung (TMB) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit zum Erreichen der maximalen Farbintensität, wird die Enzymreaktion gestoppt und die Absorption bestimmt.

Die NSE-Konzentration in der Probe wird mit einer Standardkurve berechnet.

Die Intensität der Färbung ist proportional zur NSE-Konzentration in der Probe.

3 REAGENZIEREN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG

3.1 Im Testkit enthaltene Reagenzien und Materialien

1. **Standards (CAL 0 - CAL4)**, 2 Fläschchen pro Standard, lyophilisiert
Bitte Kapitel 6.1 sorgfältig lesen.
2. **Control** (Kontrollen), je zwei Fläschchen, lyophilisiert
Negative und positive Kontrolle
Bitte Kapitel 6.1 sorgfältig lesen.
3. **Incubation Buffer** (Inkubationspuffer), 1 Fläschchen, 50 mL, Phosphatbuffer (50 mM), pH 7,4; BSA (1 g/L)
4. **Conjugate** (Konjugat), 1 Fläschchen, 1 mL, Monoklonaler anti-hNSE-Antikörper, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP)
5. **Microplate** (Beschichtete Mikrotiterplatte), 1 brechbare Mikrotiterplatte, Monoklonaler anti-hNSE-Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden
6. **TMB-Substrate** (TMB-Substrat), 1 Fläschchen, 15 mL, H₂O₂-TMB 0,26 g/L (Hautkontakt vermeiden)
7. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 15 mL, Schwefelsäure 0,15 mol/L (Hautkontakt vermeiden)
8. **Wash Solution 50X** (Waschlösung) 50X-konzentriert, 1 Fläschchen) 20 mL NaCl 45 g/L Tween 20 (55 g/L)

3.2 Nicht im Testkit enthaltene erforderliche Reagenzien

Destilliertes Wasser.

3.3 Erforderliche Hilfsmittel und Geräteausstattung

Pipetten und Dispenser.

Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm, 620-630 nm))

Wichtige Hinweise

Die Kalibratoren und Kontrollen enthalten humanes NSE in einer proteinhaltigen Stabilisierungsmatrix.

Alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C im Dunkeln lagern.

Den Beutel mit Reagenz 4 (Beschichtete Mikrotiterplatte) erst öffnen, wenn er Raumtemperatur angenommen hat und sofort nach Gebrauch wieder verschließen. Nach dem Öffnen ist die Mikrotiterplatte bis zum Verfallsdatum stabil.

4 WARNHINWEISE

- Dieses Testkit ist nur für In-vitro-Diagnostik zur Anwendung durch Fachpersonal bestimmt. Nicht zur inneren oder äußeren Anwendung bei Mensch oder Tier geeignet.
- Beim Arbeiten mit den enthaltenen Reagenzien geeignete persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- Beim Arbeiten mit Blutprodukten die GLP-(„Good laboratory practice“) Richtlinien befolgen.
- Manche Reagenzien enthalten kleine Mengen an Proclin 300 als Konservierungsmittel. Kontakt mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.
- Das TMB-Substrat enthält eine reizende Substanz, die beim Einatmen, Verschlucken oder der Aufnahme über die Haut gesundheitsschädlich sein kann. Um eine Schädigung zu verhindern, Einatmen, Verschlucken oder Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Schwefelsäure ist giftig und ätzend und kann bei Einnahme toxisch sein. Um Verätzungen zu verhindern, Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Reagenz TMB/H₂O₂ keinem direkten Sonnenlicht, Metallen oder Oxidationsmitteln aussetzen. Die Lösung nicht einfrieren.
- Diese Methode erlaubt die Bestimmung von humanem NSE innerhalb des Konzentrationsbereichs der CAL 0 bis CAL 4. **Die Standardkonzentrationen sind Lot-spezifisch.**

5 VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss genau wie in dieser Anleitung angegeben eingehalten werden. Die hier dargestellten Daten zur Performance wurden unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung genannten spezifischen Reagenzien ermittelt.
- Alle Reagenzien im Originalbehälter kühl bei 2 °C - 8 °C lagern. Ausnahmen werden deutlich gekennzeichnet. Bei sachgemäßer Lagerung und Verwendung sind die Reagenzien bis zum Verfalldatum haltbar.
- Vor der Verwendung müssen alle Testkit-Komponenten und Proben Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) annehmen und gut gemischt werden.
- Die Testkit-Komponenten zwischen unterschiedlichen Chargen nicht austauschen. Das auf dem Karton und den Fläschchen aufgedruckte Verfalldatum muss eingehalten werden. Die Testkit-Komponenten nach Ablauf ihres Verfalldatums nicht mehr verwenden.
- Wenn Sie automatische Geräte verwenden, unterliegt es der Verantwortung des Anwenders zu überprüfen, ob die Tests ordnungsgemäß durchgeführt wurden.
- Unvollständige oder ungenaue Entfernung der Flüssigkeit aus den Vertiefungen kann die Testpräzision beeinträchtigen und/oder den Hintergrund verstärken. Werden automatisierte Geräte verwendet, wird empfohlen, die Anzahl der Waschschrte zu erhöhen, um die Testperformance zu verbessern.
- Die Reaktionszeit muss für alle Vertiefungen konstant gehalten werden, damit die Ergebnisse reproduzierbar sind. Das Pipettieren der Proben sollte nicht länger als 10 Minuten dauern, um Testabweichungen zu vermeiden. Falls mehr als 10 Minuten benötigt werden, muss die Reihenfolge des Pipettierens eingehalten werden. Bei Verwendung von mehreren Platten wird empfohlen, die Dosis-Wirkungs-Kurve für jede Platte zu wiederholen.
- Durch die Zugabe der TMB-Substratlösung wird eine kinetische Reaktion gestartet, die durch das Hinzufügen der Stopplösung beendet wird. Deshalb müssen die TMB-Substrat- und die Stopplösung jeweils in derselben Reihenfolge pipettiert werden, um Zeitabweichungen während der Reaktion zu vermeiden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Labor müssen befolgt werden, indem Kontrollen und/oder vereinigte Serumproben mit untersucht werden.
- Beim Auflösen und Pipettieren der Reagenzien ist größte Genauigkeit erforderlich.
- Mikrobiell kontaminierte, stark lipämische oder hämolysierte Proben nicht im Test verwenden.
- Mikrotiterplatten-Lesegeräte lesen vertikal ab. Nicht die Unterseite der Vertiefungen berühren.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Vorbereitung der Standards und Kontrollen

Standards und Kontrollen müssen vor Gebrauch mit jeweils 0,75 mL deionisiertem Wasser rekonstituiert werden.

Wichtiger Hinweis: Rekonstituierte Standards und Kontrollen sind sehr temperaturempfindlich, deshalb folgendermaßen vorgehen:

- Standards und Kontrollen mit jeweils 0,75 mL deionisiertem Wasser rekonstituieren.
- Für etwa 5 Minuten auf einem Labor-Rollmischer legen.
- Das benötigte Volumen für den Testansatz entnehmen und den Rest **sofort** portionieren und bei -20 °C einfrieren. Rekonstituierte Standards und Kontrollen sind bei -20 °C gelagert für 1 Monat stabil; wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Die Kalibratoren haben **ungefähr** folgende Konzentrationen.

	CAL 0	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4
ng/mL	0	4	20	50	100

Die korrekten Konzentrationen für die Kalkulation sind Lot-spezifisch und stehen auf den Etiketten der Standardfläschchen und auf dem Analysezertifikat.

6.2 Verdünntes Konjugat

Erst direkt vor der Verwendung herstellen.

20 µL *Conjugate* (Reagenz 4) zu 1 mL *Incubation Buffer* (Reagenz 3) hinzufügen, die benötigte Menge ist direkt proportional zur Anzahl der Tests.

Vorsichtig auf einem Rotationschüttler für mindestens 5 Minuten mischen.

6.3 Vorbereitung der Waschlösung

Der Inhalt des *Wash Buffer*-Konzentrats (50X) wird mit destilliertem oder deionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 mL aufgefüllt.

Bei kleineren Volumina das Verdünnungsverhältnis von 1:50 beachten.

Die verdünnte Waschlösung ist bei 2 °C - 8 °C mindestens 30 Tage haltbar.

6.4 Vorbereitung der Proben

Die NSE-Bestimmung wird in humanem Serum durchgeführt.

Das Serum sollte innerhalb von 60 Minuten nach der Blutentnahme abgetrennt werden, um eine Erhöhung des NSE-Wertes aufgrund einer Abgabe aus den Blutzellen zu vermeiden.

Keine hämolysierten Proben verwenden.

Plasma sollte für den NSE-Test nicht verwendet werden, dies kann zu erhöhten Werten führen.

Proben können für 1 Tag bei 2 °C - 8 °C gelagert werden; für einen längeren Zeitraum bei -20 °C.

Wiederholtes Auftauen und Wieder-Einfrieren vermeiden. Die Proben sollten nicht länger bei Raumtemperatur stehen.

6.5 Testdurchführung

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch für mindesten 30 Minuten Raumtemperatur annehmen (22 °C - 28 °C).

Nach Beendigung des Testes sofort alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C lagern, längeres Stehen bei Raumtemperatur vermeiden, für die Lagerung von Standards und Kontrollen Kapitel 6.1 beachten.

Nicht verwendete beschichtete Mikrotiter-Streifen müssen wieder zusammen mit dem beigegefügteten Trockenmittel in den Folienbeutel zurückgelegt werden, der Beutel muss fest verschlossen und bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Damit keine mikrobielle oder chemische Kontamination auftreten kann, nicht verwendete Chemikalien nicht wieder in das Originalfläschchen zurückfüllen.

Da der Test zur Erhöhung der Genauigkeit der Testergebnisse als Doppelbestimmung durchgeführt wird, für jeden Punkt der Standardkurve (CAL 0 - CAL 4) zwei Vertiefungen, für jede Kontrolle und jede Probe ebenfalls zwei Vertiefungen und für den Nullwert eine Vertiefung vorbereiten.

Reagenz	Kalibrator	Probe/Kontrolle	Nullwert (Blank)
CAL 0 - CAL 4	25 µL		
Probe/Kontrolle		25 µL	
Verdünntes Konjugat	100 µL	100 µL	
1 Stunde bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) inkubieren. Inhalt der Vertiefungen entfernen und 3-mal mit 300 µL verdünnter Waschlösung waschen. <u>Hinweis:</u> während des Waschschrilles die Platte für 5 Sekunden vorsichtig schütteln. Überschüssige Lösung durch Aufschlagen der umgedrehten Platte auf Saugpapier entfernen. Bei Verwendung eines <u>automatisierten Waschgerätes</u> die Vertiefungen mindestens 5-mal waschen.			
TMB-Substrat	100 µL	100 µL	100 µL
15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (22 °C -28 °C) inkubieren.			
Stopplösung	100 µL	100 µL	100 µL
Die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln. Die Extinktion (E) innerhalb von 5 Minuten bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620-630 nm oder gegen den Nullwert messen.			

7 QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte zur Überprüfung der Test-Performance Kontrollen mit normalen, hohen und niedrigen NSE-Spiegeln testen. Diese Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt und die Werte in jedem durchgeführten Testlauf bestimmt werden. Die Aufzeichnungen der Qualitätskontrolle sollten aufbewahrt werden, um die Performance der Testkit-Reagenzien verfolgen zu können. Angemessene statistische Methoden sollten zur Ermittlung von Trends angewendet werden. Jedes Labor sollte Grenzwerte für eine ausreichende Test-Performance festlegen. Die Achsenabschnitte der Kalibrierungskurve bei 80 %, 50 % und 20 % sollten zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit zwischen den verschiedenen Durchläufen als weitere Parameter ebenfalls überwacht werden. Außerdem sollte die maximale Extinktion mit den bisher gesammelten Werten übereinstimmen. Treten deutliche Abweichungen gegenüber der bisherigen Performance auf, so kann das auf unbemerkte Änderungen der Testbedingungen oder verdorbene Testkit-Reagenzien hinweisen. Um die Ursache der Abweichungen zu ermitteln, sollten frische Reagenzien verwendet werden.

8 ERGEBNISSE

8.1 Mittlere Extinktion

Für jeden Punkt der Standardkurve (CAL 0 - CAL 4) und für jede Probe jeweils die mittlere Extinktion (Em) berechnen.

8.2 Kalibrationskurve

Die (mittlere) Extinktion (Em) der Kalibratoren (CAL 0 - CAL 4) gegen die Konzentration auftragen. Dann eine Ausgleichskurve durch die aufgetragenen Punkte zeichnen. (z. B. kubische Splinefunktion, Sigmoid Logistic oder Vier-Parameter-Funktion).

8.3 Ermittlung der Ergebnisse

Mit den Werten für die Proben die entsprechenden Werte für die Konzentration in ng/mL aus der Kalibrationskurve ablesen.

9 REFERENZWERTE

Für die Serumwerte gelten folgende Bereiche:

	hNSE
Normalbereich	0 - 12 ng/mL
Pathologische Werte	> 12 ng/mL

Bitte beachten, dass die Ermittlung des zu erwartenden Wertebereichs für eine „normale“ Population mit einer bestimmten Methode von vielen Faktoren, wie der Spezifität und Sensitivität der verwendeten Methode und der Zusammensetzung der untersuchten Population, abhängt.

Deshalb sollten die Labors den vom Hersteller etablierten Wertebereich nur als allgemeine Orientierung verwenden und jeweils einen eigenen zu erwartenden Wertebereich mit der Bevölkerung im Einzugsbereich des Labors erstellen.

10 TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Spezifität

Der Antikörper ist spezifisch gegen die humane Neuronenspezifische Enolase gerichtet.

Werte für die Kreuzreaktivität wurden ermittelt auf Gewicht/Gewicht-Basis.

NSE Fitzgerald (Cat.No.30AN10 Lot. A99052602)	100 %
NNE Biogenesis (Cat. 6880-1004 Lot. 991105A)	<0,22 %

10.2 Sensitivität

Die niedrigste nachweisbare NSE-Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 signifikant unterscheidet, beträgt 0,19 ng/mL (Konfidenzintervall 95 %).

10.3 Präzision

10.3.1 Intra-Assay

Die Abweichung innerhalb eines Testlaufs wurde durch die wiederholte Bestimmung (16x) von zwei verschiedenen Kontrollseren in einem Testdurchlauf ermittelt.

Die Intra-Assay-Variabilität beträgt $\leq 4,4$ %.

10.3.2 Inter-Assay

Die Abweichung zwischen verschiedenen Testläufen wurde durch die wiederholte Bestimmung (10x) von zwei verschiedenen Kontrollseren mit verschiedenen Testkit-Chargen ermittelt.

Die Inter-Assay-Variabilität beträgt $\leq 11,2$ %.

10.4 Korrelation

Der NSE ELISA (EIA-4610) wurde mit einem anderen kommerziell verfügbaren Test (EIA-2353) verglichen. In beiden Testsystemen wurden entsprechend 28 Serumproben analysiert.

Die lineare Regressionskurve wurde berechnet:

$$(EIA-2353) = 1.34 \times (EIA-4610) - 0.66$$

$$r^2 = 0.971$$

10.5 Hook-Effekt

Dieser NSE ELISA zeigt bis zu der Konzentration von 5000 ng/mL keinen Hook-Effekt.

11 ENTSORGUNG

Bei der Entsorgung der Reagenzien sind die örtlichen Vorschriften zu beachten.

1 DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione della hNSE in siero umano.

Il kit NSE ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1.1 Significato clinico

L'Enolasi Neurone Specifica (2-fosfo-D-glicerato idrolasi) è un isoenzima che appartiene alla famiglia delle enolasi (omodimeri eterodimeri costituiti dalle subunità α , β e γ) e che si distingue tra queste ultime per la presenza dell'omodimero specifico $\gamma\gamma$. L'utilità clinica dell'hNSE come marcatore tumorale è correlata al carcinoma non a piccole cellule del polmone (NSCLC), al neuroblastoma, al carcinoma midollare della tiroide, carcinoma del pancreas nonché a condizioni non neoplastiche di danno neuronale e trauma cerebrale.

L'hNSE ELISA test non deve essere usato per lo screening di tumori neuroendocrini, ma per seguirne i livelli in diagnosi stabilite.

2 PRINCIPIO DEL METODO

Il test NSE ELISA è basato sulla cattura simultanea della Enolasi Neurone Specifica umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastra, l'altro coniugato con la perossidasi di rafano (HRP).

Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Infine l'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H_2SO_4).

L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di hNSE presente nel campione.

La concentrazione dell'hNSE nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

3 REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1 Reattivi e materiali forniti nel kit

1. **Standards (CAL 0 - CAL 4)**, 2 flaconi ogni Calibratore, liofilizzati;
Leggere attentamente il paragrafo 6.1
2. **Controlli**, 2 flaconi ogni Controllo, liofilizzati Negative Control e Positive Control;
Leggere attentamente il paragrafo 6.1
3. **Incubation Buffer**, 1 flacone, 50 mL Phosphate buffer 50 mM pH 7.4; BSA 1 g/L
4. **Conjugate**, 1 flacone, 1 mL Anticorpo monoclonale anti-hNSE coniugato a perossidasi di rafano (HRP)
5. **Microplate**, 1 micropiastra breakable Anticorpo monoclonale anti-hNSE assorbito sulla micropiastra
6. **TMB-Substrate**, 1 flacone, 15 mL H_2O_2 -TMB, 0,26 g/L, (evitare il contatto con la pelle)
7. **Stop Solution** (1flacone, 15 mL) Acido Solforico, 0.15 mol/L, (evitare il contatto con la pelle)
8. **Wash Solution 50X**(1 flacone, 20 mL) NaCl 45 g/L; Tween 20, 55 g/L

3.2 Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3 Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

I Calibratori e controlli contengono hNSE in una matrice proteica stabilizzante.

Conservare tutti i reattivi a 2 °C - 8 °C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit

4 AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300 come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di hNSE comprese nel range CAL 0 - CAL 4.

Il valore dei Calibratori è lotto-specifico.

5 PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2 °C - 8 °C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6 PROCEDIMENTO

6.1 Preparazione di Calibratori e Controlli

Ricostruire i Calibratori ed i Controlli ciascuno con 0,75 mL di acqua deionizzata prima dell'uso.

Nota importante: Calibratori e Controlli ricostituiti sono molto sensibili alla temperatura, pertanto si consiglia di operare come segue:

1. ricostituire Calibratori e Controlli ciascuno con 0,75 mL di acqua deionizzata
2. lasciare in agitatore a rulli per circa 5 minuti
3. prelevare l'aliquota richiesta per il dosaggio e **immediatamente** aliquotare e congelare a -20 °C i Calibratori e Controlli rimasti

I Calibratori e Controlli ricostituiti e congelati a -20 °C sono stabili per circa 1 mese; evitare cicli di congelamento e scongelamento.

I Calibratori hanno **approssimativamente** le seguenti concentrazioni:

	CAL 0	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4
ng/mL	0	4	20	50	100

Le concentrazioni esatte dei Calibratori da riportare per il calcolo della retta sono specifiche per ogni lotto, e sono indicate sull'etichetta di ogni flacone di Calibratore e sul certificato di Analisi.

6.2 Coniugato diluito

Preparare immediatamente prima dell'uso.

Aggiungere 20 µL di Conjugate (reattivo 4) a 1 mL di Incubation Buffer (reattivo 3); la quantità da preparare è proporzionale al numero di test.

Mescolare delicatamente lasciando almeno 5 minuti su agitatore rotante.

6.3 Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (50X) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL.

Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2 °C - 8 °C per almeno 30 giorni.

1.5 Preparazione del campione

La determinazione dell'hNSE può essere effettuata su siero umano.

Il siero dovrebbe essere separato dal sangue entro 60 minuti per evitare l'incremento dell'hNSE dovuto al rilascio da parte delle cellule ematiche.

Non usare campioni emolizzati.

Evitare l'uso di plasma poiché quantità significative di hNSE potrebbero essere rilasciate dalle piastrine.

I campioni possono essere mantenuti a 2 °C - 8 °C per 24 ore; per periodi più lunghi conservarli a -20 °C.

Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. Evitare di mantenere i campioni per lunghi periodi a temperatura ambiente.

6.4 Procedimento

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) per almeno 30 minuti.

Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2 °C - 8 °C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente (vedere il paragrafo 6.1 per Calibratori e Controlli).

Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2 °C - 8 °C.

Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.

Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (CAL 0 - CAL 4), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

	Calibratore	Campione/Controlli	Bianco
CAL 0 - CAL 4	25 µL		
Campione /Controlli		25 µL	
Conjugato diluito	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C). Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita. <u>Nota importante:</u> ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. <u>Lavaggi automatici:</u> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7 CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di hNSE per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8 RISULTATI

8.1 Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (CAL 0 - CAL 4) e di ogni campione.

8.2 Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun Calibratore in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Cubic Spline, Sigmoid Logistic, Four Parameter Logistic).

8.3 Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in ng/mL.

9 VALORI DI RIFERIMENTO

I valori sierici di hNSE sono compresi nei seguenti intervalli:

	hNSE
Range di normalità	0 – 12 ng/mL
Valore patologico	> 12 ng/mL

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione “normale” è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un’indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10 PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1 Specificità

L’anticorpo riconosce specificamente l’enzima neurone specifica umana.

Presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate come rapporto in peso percentuale:

NSE Fitzgerald (Cat.No.30AN10 Lot. A99052602)	100%
NNE Biogenesis (Cat. 6880-1004 Lot. 991105A)	< 0,22%

10.2 Sensibilità

La concentrazione minima di hNSE misurabile che può essere distinta dal Calibratore zero è 0.19 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.3 Precisione

10.3.1 Intra-assay

La variabilità all’interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di due differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è ≤ 4.4%.

10.3.2 Inter-assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di due differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è ≤ 11.2%.

10.4 Correlazione

Il kit NSE ELISA (EIA-4610) è stato comparato con un kit disponibile in commercio (EIA-2353).

Sono stati testati 28 campioni di siero con entrambe i sistemi.

La curva di regressione è:

$$(EIA-2353) = 1.34 \times (EIA-4610) - 0.66$$

$$r^2 = 0.971$$

10.5 Effeto Hook

Il kit NSE ELISA non mostra Effeto Hook fino a 5000 ng/mL di hNSE.

11 DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

1 USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de hNSE en suero humano.

El kit NSE ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1.1 SIGNIFICADO CLÍNICO

La enolasa neuronal específica (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa) es una isoenzima que pertenece a la familia de las enolasas (homo y heterodímeros formados por las subunidades α , β e γ) y se distingue de estas últimas por la presencia del homodímero específico $\gamma\gamma$. La utilidad clínica de la h-NSE como marcador tumoral está relacionada con el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), el neuroblastoma, el carcinoma medular de tiroides, el carcinoma de páncreas, así como con condiciones no neoplásicas de daño neuronal y trauma cerebral.

El ensayo NSE ELISA no debe usarse para el cribado de tumores neuroendocrinos, sino para seguir los niveles en diagnósticos establecidos.

2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo NSE ELISA se basa en la captura simultánea de la enolasa neuronal específica humana por parte de dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado en la microplaca y el otro conjugado con peroxidasa (HRP).

Tras un determinado período de incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

La enzima presente en la fracción unida cataliza la reacción entre el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB (TMB), desarrollando una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada (H_2SO_4).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de hNSE presente en la muestra.

La concentración de hNSE en la muestra se calcula tomando como base una serie de Calibradores.

3 REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1 Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. **Standards (CAL 0 - CAL 4)** (Calibradores) de hNSE, 2 frascos por Calibración, liofilizados;
Leer cuidadosamente la sección 6.1.
2. **Controls** (Controles), 2 frascos por control, liofilizados
Control negativo y Control positivo;
Leer cuidadosamente la sección 6.1.
3. **Incubation Buffer** (Tampón de incubación), 1 frasco, 50 mL,
Tampón fosfato (50 mM), pH 7,4; BSA (1 g/L)
4. **Conjugate** (Conjugado), 1 frasco, 1 mL,
Anticuerpo monoclonal anti-hNSE conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)
5. **Microplate** (Microplaca recubierta), 1 microplaca rompible,
Anticuerpo monoclonal anti-hNSE absorbido en la microplaca
6. **TMB-Substrate** (Sustrato TMB), 1 frasco, 15 mL,
 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)
7. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 frasco, 15 mL;
Ácido sulfúrico (0,15 mol/L) (evitar el contacto con la piel)
8. **Wash Solution 50X** (Solución de lavado) conc. 50X, 1 frasco, 20 mL,
NaCl (45 g/L); Tween 20 (55 g/L)

3.2 Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3 Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Nota

Los Calibradores y los controles contienen h-NSE en una matriz proteica estabilizante.

Conservar todos los reactivos a 2 °C - 8 °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit

4 ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300 como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de h-NSE incluidas en el rango CAL 0 - CAL 4.
El valor de los Calibradores es específico para cada lote.

5 PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2 °C - 8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6 PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de los Calibradores y de los controles

Reconstituir los Calibradores y los controles cada uno con 0,75 mL de agua desionizada antes del uso.

Nota importante: los calibradores y controles reconstituidos son muy sensibles a la temperatura, por lo que se debe proceder de la siguiente manera:

1. reconstituir los calibradores y controles cada uno con 0,75 mL de agua desionizada
2. agitar suavemente durante 5 minutos
3. tomar la cantidad correcta para el ensayo y de **inmediato** alícuota y congelar a -20 °C los calibradores y controles no utilizado

Los Calibradores y Controles reconstituido permanecen estables durante 1 mes si se conservan a -20 °C; evitar los ciclos de congelación y descongelación.

Los Calibradores calibrados tienen **aproximadamente** las siguientes concentraciones:

	CAL 0	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4
ng/mL	0	4	20	50	100

Las concentraciones exactas des Calibradores que se deben usar para el cálculo de la recta son específicas para cada lote y se indican en la etiqueta de cada frasco de Calibración y en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

6.2 Conjugado diluido

Preparar inmediatamente antes del uso.

Añadir 20 µL de conjugado (reactivo 4) a 1 mL de tampón de incubación (reactivo 3). La cantidad que se debe preparar es proporcional al número de ensayos.

Mezclar con cuidado dejando al menos 5 minutos en el agitador giratorio.

6.3 Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del frasco de 50X Solución de lavado conc. (20 mL) a 1 L con agua destilada.

Para preparar volúmenes menores.

Respetar la relación de dilución de 1:50.

La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2 °C - 8 °C durante al menos 30 días.

6.4 Preparación de la muestra

La determinación de h-NSE puede realizarse en suero humano.

El suero debe separarse de la sangre en un plazo de 60 minutos para evitar el aumento de hNSE debido a la liberación por parte de las células hemáticas.

No usar muestras hemolizadas.

Evitar el uso de plasma, puesto que las plaquetas podrían liberar cantidades significativas de hNSE.

Las muestras pueden conservarse a 2 °C - 8 °C durante 24 horas. Para períodos más largos, conservarlas a -20 °C. No congelar y descongelar las muestras repetidamente. Evitar mantener las muestras durante largos períodos a temperatura ambiente.

6.5 Procedimiento

Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) durante al menos 30 minutos.

Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2 °C - 8 °C para evitar largos periodos a temperatura ambiente (para Calibradores y Controles leer la sección 6.1).

Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2 °C - 8 °C.

Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.

Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (CAL 0 - CAL 4), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibradores	Muestra/ Controles	Blanco
CAL 0 - CAL 4	25 µL		
Muestra/ Controles		25 µL	
Conjugado diluido	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. <u>Nota importante:</u> agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. <u>Lavados automático:</u> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

7 CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de hNSE para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8 RESULTADOS

8.1 Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (CAL 0 - CAL 4) y de cada muestra.

8.2 Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (E_m) de cada calibrador en función de las concentraciones.

Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: modelo spline cúbico, logístico sigmoideo, logístico de cuatro parámetros).

8.3 Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

9 VALORES DE REFERENCIA

Los valores séricos de hNSE se incluyen en los siguientes intervalos:

	hNSE
Rango de normalidad	0 – 12 ng/mL
Valor patológico	> 12 ng/mL

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio.

Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10 PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1 Especificidad

El anticuerpo reconoce específicamente la enolasa neuronal específica humana.

Presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas como relación en peso porcentual:

NSE Fitzgerald (N.º cat. 30AN10 Lote A99052602)	100%
NNE Biogenesis (N.º cat. 6880-1004 Lote 991105A)	< 0,22%

10.2 Sensibilidad

La concentración mínima de hNSE medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es 0,19 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

10.3 Precisión

10.3.1 Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la medición de dos sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es $\leq 4,4\%$.

10.3.2 Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de dos sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 11,2\%$.

10.4 Correlación

El kit NSE ELISA (EIA-4610) se ha comparado con un kit disponible en el mercado (EIA-2353).

Se han comprobado 28 muestras de suero con ambos sistemas.

La curva de regresión es:

$$(\text{Kit en el mercado (EIA-2353)}) = 1,34 \times (\text{EIA-4610}) - 0,66$$

$$r^2 = 0,971$$

10.5 Efecto gancho

El kit NSE ELISA no muestra efecto gancho hasta 5000 ng/mL de hNSE.


11 DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

12 BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

1. Sorensen K, Brodbeck U, Paus E, Norgaard-Pedersen B. An enzyme antigen immunoassay for the determination of neuron-specific enolase in serum samples. *Clin Chim Acta*. 1988 Jul 29;175(3):337-43.
2. Drivsholm L, Osterlind K, Cooper EH, Purves DA. Neuron-specific enolase (NSE) in serum. Comparison of monoclonal versus polyclonal assay based on 392 blood samples. *Int J Biol Markers*. 1995 Jan-Mar;10(1):1-4.
3. Karnak D, Beder S, Kayacan O, Ibis E, Oflaz G. Neuron-specific enolase and lung cancer. *Am J Clin Oncol*. 2005 Dec;28(6):586-90.
4. Berger RP, Dulani T, Adelson PD, Leventhal JM, Richichi R, Kochanek PM. Identification of inflicted traumatic brain injury in well-appearing infants using serum and cerebrospinal markers: a possible screening tool. *Pediatrics*. 2006 Feb;117(2):325-32.
5. Ghayumi SM, Mehrabi S, Doroudchi M, Ghaderi A Diagnostic value of tumor markers for differentiating malignant and benign pleural effusions of Iranian patients. *Pathol Oncol Res*. 2005;11(4):236-41. Epub 2005 Dec 31.
6. Sawauchi S, Taya K, Murakami S, Ishi T, Ohtsuka T, Kato N, Kaku S, Tanaka T, Morooka S, Yuhki K, Urashima M, Abe T. Serum S-100B protein and neuron-specific enolase after traumatic brain injury. *No Shinkei Geka*. 2005 Nov;33(11):1073-80
7. Ramont L, Thoannes H, Volondat A, Chastang F, Millet MC, Maquart FX. Effects of hemolysis and storage condition on neuron-specific enolase (NSE) in cerebrospinal fluid and serum: implications in clinical practice. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(11):1215-7.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité