

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8

CONTENT

1. INTENDED USE	9
2. SUMMARY AND EXPLANATION	9
3. PRINCIPLE OF THE TEST	9
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	10
5. KIT COMPONENTS	11
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	12
7. TEST PROCEDURE	12
8. QUALITY CONTROL	14
9. CALCULATION OF RESULTS	14
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	15

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙРОНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЕНОЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «НСЕ-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «НСЕ-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации нейронспецифической енолазы в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. НСЕ (нейронспецифическая енолаза) - цитоплазматический гликолитический фермент, присутствующий в клетках нейроэктодермального происхождения, нейронах головного мозга и периферической нервной системы. Нормальное содержание НСЕ в сыворотке крови людей не превышает 13 нг/мл. Количественное определение НСЕ в сыворотке или плазме крови, особенно одновременно с определением карциноэмбрионального антигена (КЭА) (ХЕМА кат. № K224) и CYRFA21-1 (ХЕМА кат. № K236), используется в целях контроля течения и терапии мелкоклеточного рака лёгкого и нейробластомы.

1.3. Повышение уровня НСЕ в сыворотке крови отмечается при лейкозах, раке почек, после лучевой и рентгенотерапии; у больных с доброкачественными заболеваниями легких, а также при почечной недостаточности, доброкачественных заболеваниях печени, приеме муко- и бронхолитиков, курении.

1.4. При заборе крови необходимо учитывать, что фермент содержится в эритроцитах и тромбоцитах, следовательно, **гемолиз значительно завышает результаты анализа**. Не допускается длительное хранение цельной крови так как при этом уровень НСЕ неспецифически повышаются; центрифугирование необходимо проводить не позднее, чем через 1 час после взятия пробы.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение нейронспецифической енолазы основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к НСЕ человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание НСЕ, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к НСЕ человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации нейронспецифической енолазы в исследуемом образце. Концентрацию нейронспецифической енолазы в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания нейронспецифической енолазы в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к НСЕ человека с другими анализатами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
КЭА	<0.1
СА19-9	<0.1
СА15-3	<0.1

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания НСЕ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «НСЕ-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации НСЕ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей НСЕ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 10–150 мкг/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствии измеренной концентрации НСЕ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 30 мкг/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «НСЕ-ИФА» концентрация НСЕ в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.6 мкг/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P234Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C234Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе основе трис-буфера (pH 7.2-7.4), содержащие известные количества Нейронспецифической енолазы - 0; 10; 30; 80; 150 мкг/л, готовы к использованию (по 0.8 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q234Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием нейронспецифической енолазы, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4	T234Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5	S011Z	DIL	ИФА-Буфер , готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
6	R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9	N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10	K234I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «НСЕ-ИФА»	1	шт.	-
11	K234Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «НСЕ-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «НСЕ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, ИФА-Буфер, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа **не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови**, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации нейронспецифической енолазы в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Внесите во все лунки планшета по 100 мкл ИФА-Буфера.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 25 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
4	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
6	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
7	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
8	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
9	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25°С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
10	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
11	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин. после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
12	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация НСЕ в калибровочных пробах (мкг/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
13	Определите по калибровочному графику содержание НСЕ в исследуемых образцах.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций НСЕ в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.6 мкг/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (150 мкг/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация НСЕ ниже 0.6 мкг/л или выше 150 мкг/л.

Исследуемая группа	Единицы, мкг/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	-	13.0

По вопросам, касающимся качества Набора «**НСЕ-ИФА**», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105043, Москва, а/я 58, тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF NEURON-SPECIFIC ENOLASE IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of neuron-specific enolase in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of neuron-specific enolase in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

2.1. NSE is a cytoplasmic enzyme involved in glycolysis and found in cells derived from neuroectoderma, neurones of the central and peripheral nervous system. Normal NSE level in serum is NMT 13 ng/ml. Measurement of NSE level in human serum or plasma – especially, along with determination of CEA (XEMA Cat. # K224) and CYFRA 21-1 (XEMA Cat. # K236) – is used for monitoring of course and treatment of small cell lung carcinoma (SCLC) and neuroblastoma.

2.2. Elevated serum NSE level is found in leucaemia, kidney cancer, after radiotherapy as well as in patients with benign lung diseases, renal failure, benign liver diseases, in subjects using broncholytic and mucolytic preparations and in smokers.

2.3. It should be stressed that NSE is found also in RBC and platelets – it means that **even a slight haemolysis may cause a significant rise of the result**. Therefore, a blood sample should be centrifuged not later than 1 hour after sampling – otherwise, NSE level will rise in a non-specific manner, and the result will be falsely elevated.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to human NSE-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies - murine monoclonal to human NSE, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components until exp. date
1	NSE EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp. date
2	Calibrator set, 0.8 ml each. The set contains 5 calibrators: 0.10; 30; 80; 150 µg/l	5	pcs	blue (C1 - colourless)	2 months
3	Control serum (0.8 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4	Conjugate, 11 ml	1	pcs	red	until exp. date
5	EIA buffer 11 ml	1	pcs	blue	until exp. date
6	Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
7	Washing solution concentrate 21X, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp. date Diluted washing solution – 1 month at 2...+8 °C or 5 days at RT
8	Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
9	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10	Instruction NSE EIA	1	pcs		N/A
11	QC data sheet NSE EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±0.1 °C
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at 2 to 8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1–5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Pipet 100 µl of EIA buffer into each well.
3	Pipet 25 µl of calibrators CAL 1–5, control samples CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
4	Incubate 30 minutes at 37 °C .
5	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times
6	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
7	Incubate 30 minutes at 37 °C .
8	Wash the strips 5 times.
9	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
10	Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C
11	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
12	Measure OD (optical density) at 450 nm.
13	Set photometer blank on first calibrator
14	Apply point-by-point method for data reduction.

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

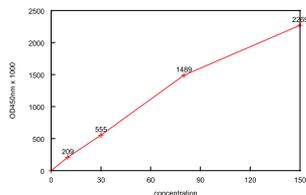
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus neuron-specific enolase concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of neuron-specific enolase in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 µg/l	0.06
CAL 2	10 µg/l	0.27
CAL 3	30 µg/l	0.61
CAL 4	80 µg/l	1.55
CAL 5	150 µg/l	2.33



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutical measures. Each laboratory should establish its own normal range for NSE. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, U/ml	
	Lower limit	Upper limit
Healthy donors	-	13.0

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
CEA	<0.1
CA19.9	<0.1
CA15-3	<0.1

11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 0.6 µg/l.

11.3. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different neuron-specific enolase concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known neuron-specific enolase concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

