

Instructions for use

h-NSE ELISA

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

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 Standard curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION**3.1 Reagents and materials supplied in the kit**

Standards and Controls - lyophilized*

Cat. no.	Symbol	Standard	concentration **	Volume/Vial
TM E-4701	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	2 x 0.75 ml
TM E-4702	STANDARD B	Standard B	4 ng/ml	2 x 0.75 ml
TM E-4703	STANDARD C	Standard C	20 ng/ml	2 x 0.75 ml
TM E-4704	STANDARD D	Standard D	50 ng/ml	2 x 0.75 ml
TM E-4705	STANDARD E	Standard E	100 ng/ml	2 x 0.75 ml
TM E-4751	CONTROL 1	Control 1	<i>The right concentration are stated on the standard vial label and on the QC-Report</i>	2 x 0.75 ml
TM E-4752	CONTROL 2	Control 2		2 x 0.75 ml

* please read carefully paragraph 6.1

**approximately concentration: the right concentration for the curve compute are lot-specific and are stated on the standard vial labels and on the QC-Report.

TM E-4713 INC-BUFF **Incubation Buffer**
 Content: Phosphate buffer (50 mM), pH 7.4; BSA (1 g/l)
 Volume: 1 x 50 ml

TM E-4740 CONJUGATE-CONC **Conjugate**
 Content: Monoclonal anti hNSE antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
 Volume: 1 x 1 ml

TM E-4731 96 **Microplate**
 Content: 1 breakable microplate, Monoclonal anti hNSE antibody adsorbed on the microplate

MS E-0055 SUBSTRATE **TMB Substrate**
 Content: H₂O₂-TMB 0.26g/l (avoid any skin contact)
 Volume: 1 x 15 ml

MS E-0080**STOP-SOLN****Stop Solution**

Content: Sulphuric acid 0.15 mol/l, (avoid any skin contact)

Volume: 1 x 15 ml

Hazards
identification:

H290 May be corrosive to metals.

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

SA E-0030**WASH-CONC 50x****Wash Solution - 50x concentrated**

Content: NaCl (45 g/l); Tween 20 (55 g/l)

Volume: 1 x 20 ml

3.2 Necessary reagents not supplied

Distilled water.

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplate reader (450 nm, 620 - 630 nm)

Note

The Standards 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 Standard A - Standard E.
Standards 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 Standards have **approximately** the following concentrations:

	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Standard E
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 QC-Report.

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 Standards 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 standard curve (Standard A – Standard E), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Standard	Sample/ Controls	Blank
Standard A – Standard E	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 standard 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 (E_m) corresponding to the single points of the standard curve (Standard A – Standard E) and of each sample.

8.2 Standard curve

Plot the values of absorbance (E_m) of the Standards (Standard A – Standard E) 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 standard 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 Standard A 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 (x) kit was compared to another commercially available hNSE assay (y). 28 serum samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve is:

$$(y) = 1.34 \times (x) - 0.66$$

$$r^2 = 0.971$$

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.

12. LITERATURE

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 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:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	LOT	Batch code	IVD	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE labelled
	Caution	REF	Catalogue number		

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. REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG

3.1 Im Testkit enthaltene Reagenzien und Materialien

Standards und Controls - lyophilisiert*

Cat. no.	Symbol	Standard	Konzentration **	Volume/Vial
TM E-4701	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	2 x 0,75 ml
TM E-4702	STANDARD B	Standard B	4 ng/ml	2 x 0,75 ml
TM E-4703	STANDARD C	Standard C	20 ng/ml	2 x 0,75 ml
TM E-4704	STANDARD D	Standard D	50 ng/ml	2 x 0,75 ml
TM E-4705	STANDARD E	Standard E	100 ng/ml	2 x 0,75 ml
TM E-4751	CONTROL 1	Control 1	<i>Die korrekte Konzentration steht auf den Etiketten der Standardfläschchen und auf dem QC-Report.</i>	2 x 0,75 ml
TM E-4752	CONTROL 2	Control 2		2 x 0,75 ml

* Bitte Kapitel 6.1 sorgfältig lesen

**ungefähre Konzentration: die korrekte Konzentration für die Kalkulation sind Lot-Spezifisch und stehen auf den Etiketten der Standardfläschchen und auf dem QC-Report.

TM E-4713 INC-BUFF Incubation Buffer (Inkubationspuffer)

Inhalt: Phosphatpuffer (50 mM); pH 7,4; BSA (1 g/l)

Volumen: 1 x 50 ml

TM E-4740 CONJUGATE-CONC Conjugate (Konjugat)

Inhalt: Monoklonaler anti-hNSE-Antikörper, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP)

Volumen: 1 x 1 ml

TM E-4731 96 Microplate (beschichtete Mikrotiterplatte)

Inhalt: 1 brechbare Mikrotiterplatte, Monoklonaler anti-hNSE-Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden

MS E-0055 SUBSTRATE TMB Substrate (TMB-Substrat)

Inhalt: H₂O₂-TMB 0,26g/l (Hautkontakt vermeiden)

Volumen: 1 x 15 ml

MS E-0080**STOP-SOLN****Stop Solution (Stopplösung)**

Inhalt: Schwefelsäure 0,15 mol/l (Hautkontakt vermeiden)
 Volumen: 1 x 15 ml
 Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
 H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

SA E-0030**WASH-CONC 50x****Wash Solution (Waschlösung) - 50x-konzentriert**

Inhalt: NaCl (45 g/l); Tween 20 (55 g/l)
 Volumen: 1 x 20 ml

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 Standards 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 des Standards A bis Standards E.

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:

1. Standards und Kontrollen mit jeweils 0,75 ml deionisiertem Wasser rekonstituieren.
2. Für etwa 5 Minuten auf einem Labor-Rollmischer legen.
3. 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 Standards haben ungefähr folgende Konzentrationen.

	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Standard E
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 QC-Report.

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 Rotationsschüttler 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 beigefügten 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 (Standard A – Standard E) zwei Vertiefungen, für jede Kontrolle und jede Probe ebenfalls zwei Vertiefungen und für den Nullwert eine Vertiefung vorbereiten.

Reagenz	Standard	Probe/Kontrolle	Nullwert (Blank)
Standard A – Standard E	25 µl		
Probe/Kontrolle		25 µl	
Verdünntes Konjugat	100 µl	100 µl	
<p>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 Waschschrtes die Platte für 5 Sekunden vorsichtig schütteln, Überschüssige Lösung durch Aufschlagen der umgedrehten Platte auf Saugpapier entfernen. Bei Verwendung eines <u>automatisierten Wascherätes</u> die Vertiefungen mindestens 5-mal waschen.</p>			
TMB-Substrat	100 µl	100 µl	100 µl
<p>15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (22 °C -28 °C) inkubieren.</p>			
Stopplösung	100 µl	100 µl	100 µl
<p>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.</p>			

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 (Standard A – Standard E) und für jede Probe jeweils die mittlere Extinktion (E_m) berechnen.

8.2 Standardkurve

Die (mittlere) Extinktion (E_m) der Standards (Standard A – Standard E) 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 Standardkurve 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 Standard A 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 (x) wurde mit einem anderen kommerziell verfügbaren Test (y) verglichen. In beiden Testsystemen wurden entsprechend 28 Serumproben analysiert.

Die lineare Regressionskurve wurde berechnet:

$$y = 1,34 \times (x) - 0,66$$

$$r^2 = 0,971$$

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.

12. LITERATUR

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 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.

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer		