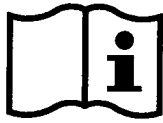


# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

de  
medi  
tec

EN ISO 9001  
certified company



## User's Manual

# NSE ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of  
NSE in human serum



DE2353



96

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.  
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.  
 Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco 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 .....                                     | 3  |
| 2  | SUMMARY AND EXPLANATION OF THE ASSAY .....             | 3  |
| 3  | PRINCIPLE OF THE TEST .....                            | 3  |
| 4  | REAGENTS .....   | 4  |
| 5  | WARNINGS AND PRECAUTIONS .....                         | 4  |
| 6  | SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING.....                  | 4  |
| 7  | PROCEDURE .....  | 5  |
| 8  | CALCULATION OF RESULTS .....                           | 8  |
| 9  | LIMITATIONS OF THE PROCEDURE .....                     | 9  |
| 10 | EXPECTED VALUES .....                                  | 9  |
| 11 | PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....                       | 9  |
| 12 | WARRANTY .....   | 10 |
|    |  |    |
| 1  | VERWENDUNGSZWECK .....                                 | 11 |
| 2  | KLINISCHE BEDEUTUNG .....                              | 11 |
| 3  | TESTPRINZIP.....                                       | 11 |
| 4  | REAGENZIEN.....  | 12 |
| 5  | WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN .....             | 12 |
| 6  | PROBENVORBEREITUNG.....                                | 12 |
| 7  | DURCHFÜHRUNG .....                                     | 13 |
| 8  | BERECHNUNG DER ERGEBNISSE .....                        | 15 |
| 9  | AUSSAGEFÄHIGKEIT DES TESTS .....                       | 16 |
| 10 | ZU ERWARTENDE WERTE .....                              | 16 |
|    |  |    |
| 1  | USO PREVISTO .....                                     | 17 |
| 2  | INTRODUZIONE.....                                      | 17 |
| 3  | PRINCIPIO DEL DOSAGGIO.....                            | 17 |
| 4  | REATTIVI.....  | 18 |
| 5  | AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....                          | 18 |
| 6  | PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI .....             | 19 |
| 7  | PROCEDIMENTO OPERATIVO .....                           | 19 |
| 8  | CALCOLO DEI RISULTATI .....                            | 23 |
| 9  | LIMITI DEL DOSAGGIO .....                              | 23 |
| 10 | VALORI ATTESI .....                                    | 24 |
| 11 | PRESTAZIONI METODOLOGICHE.....                         | 24 |
| 12 | AVVERTENZE .....                                       | 24 |
|    |  |    |
| 13 | LITERATURE REFERENCES / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA ..... | 25 |
|    |  |    |
|    | SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS .....               | 26 |

**1 INTENDED USE**

The NSE ELISA kit is intended for the quantitative determination of NSE in human serum.

**2 SUMMARY AND EXPLANATION OF THE ASSAY**

The glycolytic enzyme enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase, EC42.1.11) exists as several dimeric isoenzymes ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$  and  $\gamma\gamma$ ) composed of three distinct subunits  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ . The  $\gamma$  unit is found either in a homologous  $\gamma\gamma$ - or in a heterologous  $\alpha\gamma$ -isoenzyme and is known as neuron-specific enolase (NSE). The monoclonal antibodies used in the NSE ELISA bind to the  $\gamma$ -subunit of the enzyme and thereby detects both the  $\gamma\gamma$  and the  $\alpha\gamma$  forms (1, 2).

The NSE levels are low in healthy subjects and subjects with benign diseases. Elevated levels are commonly found in patients with malignant tumours with neuroendocrine differentiation, especially small cell lung cancer (SCLC) (3) and neuroblastoma (4).

Quantitative determination of NSE in serum may be valuable in the management of patients with suspected or diagnosed SCLC or neuroblastoma, to aid in the differential diagnosis and to monitor the effect of treatment (5, 6).

**3 PRINCIPLE OF THE TEST**

The NSE ELISA is a solid phase, non-competitive immunoassay based on two monoclonal antibodies (derived from mice) directed against two separate antigenic determinants of the NSE molecule. The monoclonal antibodies (MAb) used bind to the  $\gamma$ -subunit of the enzyme and thereby detects both the  $\gamma\gamma$  and the  $\alpha\gamma$  form. Calibrators and patient samples are incubated together with biotinylated Anti-NSE MAb E21 and horseradish peroxidase (HRP) labelled Anti-NSE MAb E17 in streptavidin coated micro strips. After washing, buffered Substrate/Chromogen reagent (hydrogen peroxide and 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine) is added to each well and the enzyme reaction is allowed to proceed. During the enzyme reaction a blue colour will develop if antigen is present. The intensity of the colour development is proportional to the amount of NSE present in the samples. The colour intensity is determined in a microplate spectrophotometer at 620 nm (or optionally at 405 nm after addition of Stop Solution). Calibration curves are constructed for each assay by plotting absorbance value versus the concentration for each standard. The NSE concentrations of patient samples are then read from the calibration curve.

#### 4 REAGENTS

- Each NSE ELISA kit contains reagents for 96 tests.
  - The expiry date of the kit is stated on the label on the outside of the kit box.
  - Do not use the kit beyond the expiry date.
  - Do not mix reagents from different kit lots.
  - Store the kit at 2 - 8 °C. Do not freeze.
  - Opened reagents are stable according to the table below provided they are not contaminated, stored in resealed original containers and handled as prescribed. Return to 2 - 8 °C immediately after use.
1. **Microtiterplate [SORB MT]** 1 plate; 2 - 8 °C until expiry date stated on the plate. 12 x 8 breakable wells coated with streptavidin. After opening, immediately return unused strips to the aluminium pouch containing desiccant and reseal carefully to keep dry.
  2. **NSE Calibrators [CAL]** 5 vials, lyophilised, 0.75 mL each; 4 weeks at 2 - 8 °C; 3 months at -20 °C. The lyophilised calibrators contain human NSE in a protein matrix with 0.01 % of a non-azide preservative. *To be reconstituted* with 0.75 mL distilled water before use. **NOTE:** The exact NSE concentration is lot specific and is indicated on the QC data sheet.
  3. **Biotin Anti-NSE [BIOTIN Ab]** 1 x 15 mL; 2 - 8 °C until expiry date stated on the vial. Biotin Anti-NSE monoclonal antibody from mouse, approximately 2 µg/mL. Contains phosphate buffer (pH 7.1), bovine serum albumin, blocking agents, an inert blue dye and 0.01 % methyl-isothiazolone (MIT) as preservative. *To be mixed* with Tracer, HRP Anti-NSE before use.
  4. **Tracer, HRP Anti-NSE [CONJ]** 1 x 0.75 mL; 2 - 8 °C until expiry date stated on the vial. Stock solution of HRP Anti-NSE monoclonal antibody from mouse, approximately 40 µg/mL. *To be mixed* with Biotin Anti-NSE prior to use. Contains 0.02 % methyl-isothiazolone (MIT), 0.02 % bromonitrodioxane and 20 ppm Proclin 300 as preservatives.
  5. **TMB HRP-Substrate [SUB TMB]** 1 x 12 mL; 2 - 8 °C until expiry date stated on the vial. *Ready for use.* Contains buffered hydrogen peroxide and 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB). **Indications of instability:** The TMB HRP-Substrate should be colourless or slightly bluish. A blue colour indicates that the reagent has been contaminated and should be discarded.
  6. **Stop Solution [STOP SOLN]** 1 x 15 mL; 2 - 8 °C until expiry date stated on the vial. *Ready for use.* Contains 0.12 M hydrochloric acid.
  7. **Wash Concentrate [BUF WASH 25X]** 1 x 50 mL; 2 - 8 °C until expiry date stated on the bottle; *To be diluted* with water 25 times before use. A Tris-HCl buffered salt solution with Tween 20. Contains Germall II as preservative.

#### 5 WARNINGS AND PRECAUTIONS

##### For in vitro diagnostic use

- For Professional Use Only
- Please refer to the U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., US) publication No. (CDC) 88-8395 on laboratory safety or any other local or national regulation.
- Handle all patient specimens as potentially infectious.
- Follow local guidelines for disposal of all waste material.

##### Caution

Each donor unit used in the preparation of human source reagent has been tested and found to be Non Reactive for HIV-1/2 Antibody, HCV Antibody and Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Since no method can completely rule out the presence of blood borne diseases, the handling and disposal of human source reagents from this product should be made as if they were potentially infectious.

#### 6 SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

The NSE ELISA is intended for use with serum. Collect blood by venipuncture and separate the serum according to common procedures. Serum should be separated from the clot within 60 minutes of collection to avoid leaking of NSE from blood cells. Do not use haemolysed samples. Plasma is not recommended since significant amounts of NSE can be released from platelets. Samples can be stored at 2-8°C for 24 hours. For longer periods store samples at -70°C or below. Samples should not be stored in a self-defrosting freezer and not be thawed and refrozen before analysis. Bring frozen samples to room temperature and mix thoroughly by gently inverting multiple times before analysis. Samples that contain gross particulates should be centrifuged at 10.000 x g for 10 minutes, prior to use to eliminate any particulate matter that may have developed from the thawing process. Analyze thawed samples within one hour.

## 7 PROCEDURE

### 7.1 Materials required but not supplied with the kit

1. **Microplate shaker**  
Shaking should be medium to vigorous, approximately 700-1100 oscillations/min.
2. **Microplate wash device**  
Automatic plate washer capable of performing 1 and 6 washing cycles with a minimal fill volume of 350 µL/well/washcycle. An 8-channel pipette with disposable plastic tips for delivery of 350 µL is recommended if an automatic microplate washer is not used.
3. **Microplate spectrophotometer**  
with a wavelength of 620 nm and/or 405 nm, and an absorbance range of 0 to 3.0.
4. **Precision pipettes**  
with disposable plastic tips for dispensing microlitre volumes. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 100 µL is useful but not essential. Pipettes for dispensing millilitre volumes.
5. **Distilled or deionized water**  
For reconstitution of NSE Calibrators and for preparation of diluted wash solution.

### 7.2 Procedural notes

1. A thorough understanding of this package insert is necessary to ensure proper use of the NSE ELISA kit. The reagents supplied with the kit are intended for use as an integral unit. Do not mix identical reagents from kits having different lot numbers. Do not use the kit reagents after the expiry date printed on the outside of the kit box.
2. Reagents should be allowed to reach room temperature (20-25 °C) prior to use. The assay should only be performed at temperatures between 20-25 °C to obtain accurate results. Frozen sera must be gently but thoroughly mixed after thawing.
3. Before starting to pipette calibrators and patient specimens it is advisable to mark the strips to be able to clearly identify the samples during and after the assay.
4. The requirement for efficient and thorough washing for separation of bound and unbound antigen and reagents from the solid-phase bound antibody-antigen complexes is one of the most important steps in an EIA. In order to ensure efficient washing make sure that all wells are completely filled to the top edge with wash solution during each wash cycle, that wash solution is dispensed at a good flow rate, that the aspiration of the wells between and after the wash cycles is complete and that the wells are empty. If there is liquid left, invert the plate and tap it carefully against absorbent paper.

#### **Automatic strip washer:**

Follow the manufacturer's instructions for cleaning and maintenance diligently and wash the required number of wash cycles prior to and after each incubation step. It's highly recommended to use strip process mode and overflow wash mode with a dispensing volume of 800 µL. The aspiration/wash device should not be left standing with the Wash Solution for long periods, as the needles may get clogged resulting in poor liquid delivery and aspiration.

5. The TMB HRP-Substrate is very sensitive for contamination. For optimal stability of the TMB HRP-Substrate, pour the required amount from the vial to a carefully cleaned reservoir or preferably a disposable plastic tray to avoid contamination of the reagent. Be sure to use clean disposable plastic pipette tips (or respenser pipette tip).
6. Be sure to use clean disposable plastic pipette tips and a proper pipetting technique when handling samples and reagents. Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or surface of the liquid. A proper pipetting technique is of particular importance when handling the TMB HRP-Substrate solution.

**7.3 Preparation of reagents**

**NSE Calibrators** 4 weeks at 2 - 8 °C; 3 months at – 20 °C; Add exactly 0.75 mL of distilled water to each vial and mix gently. Allow standing for at least 15 minutes to reconstitute.

**NOTE:** The concentration of the calibrators is stated on the labels and should be used for calculation of the results.

**Wash Solution** 2 weeks at 2 - 25 °C in a sealed container. Pour the 50 mL Wash Concentrate into a clean container and dilute 25-fold by adding 1200 mL of distilled or deionised water to give a buffered Wash Solution.

**Antibody Solution** 3 weeks at 2 - 8 °C. Prepare the required quantity of Antibody Solution by mixing 50 µL of Tracer HRP Anti-NSE- with 1 mL of Biotin Anti-NSE per strip (see table below):

| No. of Strips | Tracer, HRP Anti-NSE (µL) | Biotin Anti-NSE (mL) |
|---------------|---------------------------|----------------------|
| 1             | 50                        | 1                    |
| 2             | 100                       | 2                    |
| 3             | 150                       | 3                    |
| 4             | 200                       | 4                    |
| 5             | 250                       | 5                    |
| 6             | 300                       | 6                    |
| 7             | 350                       | 7                    |
| 8             | 400                       | 8                    |
| 9             | 450                       | 9                    |
| 10            | 500                       | 10                   |
| 11            | 550                       | 11                   |
| 12            | 600                       | 12                   |

Be sure to use a clean plastic or glass bottle for preparation of Antibody Solution.

**Alternative:** Pour the content of the HRP Anti-NSE-Tracer into the vial of Biotin Anti-NSE and mix gently. Be sure that all content of the Tracer is transferred to the vial of Biotin Anti-NSE.

**NOTE:** The Antibody Solution is stable for 3 weeks at 2 - 8 °C. Do not prepare more Antibody Solution than will be used within this period and make sure that it is stored properly.

#### 7.4 Assay procedure

Perform each determination in duplicate for both calibrators and patient samples.

A calibration curve should be run with each assay. All reagents and samples must be brought to room temperature (20 - 25 °C) before use.

1. Start to prepare NSE Calibrators, Wash Solution and Antibody Solution. It is important to use clean containers. Follow the instructions carefully.
2. Transfer the required number of microplate strips to a strip frame. (Immediately return the remaining strips to the aluminium pouch containing a desiccant and reseal carefully). Wash each strip once with the Wash Solution. Do not wash more strips than can be handled within 30 min.
3. Pipette 25 µL of the NSE Calibrators (Cal A, B, C, D, E) and patient specimens (unknowns) into the strip wells according to the following scheme:

|          | 1     | 2        | 3        | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|----------|-------|----------|----------|---|---|---|---|---|
| <b>A</b> | Cal A | Cal E    | Unkown 4 |   |   |   |   |   |
| <b>B</b> | Cal A | Cal E    | etc.     |   |   |   |   |   |
| <b>C</b> | Cal B | Unkown 1 |          |   |   |   |   |   |
| <b>D</b> | Cal B | Unkown 1 |          |   |   |   |   |   |
| <b>E</b> | Cal C | Unkown 2 |          |   |   |   |   |   |
| <b>F</b> | Cal C | Unkown 2 |          |   |   |   |   |   |
| <b>G</b> | Cal D | Unkown 3 |          |   |   |   |   |   |
| <b>H</b> | Cal D | Unkown 3 |          |   |   |   |   |   |

4. Add 100 µL of Antibody Solution to each well using a 100 µL precision pipette (or an 8-channel 100 µL precision pipette). Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or surface of the liquid.
5. Incubate the plate for **1 hour (± 10 min) at room temperature (20 – 25 °C)** with constant shaking of the plate using a microplate shaker.
6. After the incubation aspirate and wash each strip 6 times.
7. Add 100 µL of TMB HRP-Substrate Solution to each well using the same procedure as in item 4. The TMB HRP-Substrate should be added to the wells as quickly as possible and the time between addition to the first and last well should not exceed 5 min.
8. Incubate for **30 min (± 5 min) at room temperature** with constant shaking. Avoid exposure to direct sunlight.
9. Immediately read the absorbance at 620 nm in a microplate spectrophotometer.

#### Option

If the laboratory does not have access to a microplate spectrophotometer capable of reading at 620 nm the absorbance can be determined as in item 10.

10. Add 100 µL of Stop Solution, mix and read the absorbance at 405 nm in a microplate spectrophotometer within 15 min after addition of Stop Solution.

#### 7.5 Measurement range

The NSE ELISA measures concentrations between 1 µg/L and approximately 150 µg/L. If NSE concentrations above the measuring range are to be expected, it is recommended to dilute samples with normal human serum prior to analysis.

**NOTE:** The serum used for dilution should also be measured in order to determine the endogenous NSE concentration (see “Calculation of results”).

#### 7.6 Quality control

Tumor Marker Control Sera Levels 1 and 2 (available separately, REF DE4458) are recommended for validation of the assay series. If values outside of the specified range are obtained, a complete check of reagents and reader performance should be made and the analysis repeated.

#### 7.7 Reference materials

Since no common reference material is available for NSE antigen, NSE ELISA Calibrator values are assigned against a set of in-house reference calibrators.

**8 CALCULATION OF RESULTS**

If a microplate spectrophotometer with built-in data calculation program is used refer to the manual for the spectrophotometer and create a program using the concentration stated on the label of each of the NSE calibrators.

For automatic calculation of NSE results it is recommended to use either of the following methods:

- Cubic spline curve fit method. Calibrator A should be included in the curve with the value 0 µg/L.
- Spline smoothed curve fit method. Calibrator A should be used as plate blank.
- Interpolation with point-to-point evaluation. Calibrator A should be included in the curve with the value 0 µg/L.
- Quadratic curve fit method. Calibrator A should be included in the curve with the value 0 µg/L.

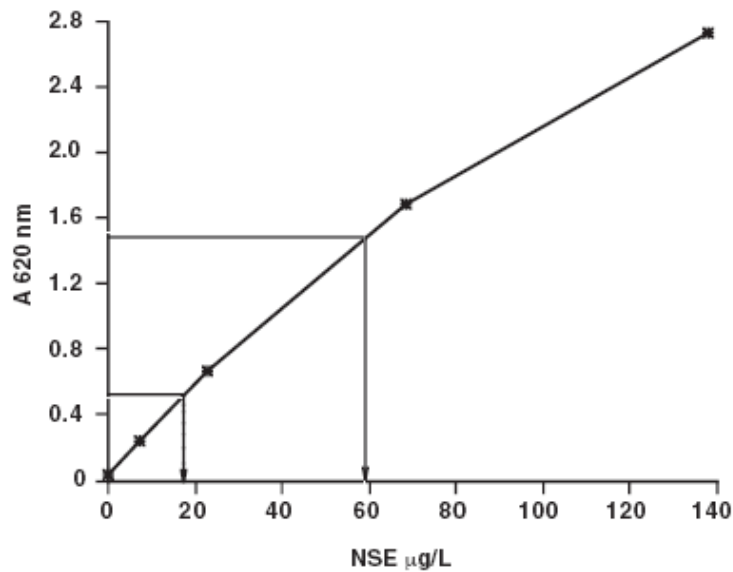
**NOTE:** 4-Parametric or Linear regression evaluation methods should not be used.

For manual evaluation, a calibration curve is constructed by plotting the absorbance (A) values obtained for each NSE Calibrator against the corresponding NSE concentration (in µg/L), see figure. The unknown NSE concentrations can then be read from the calibration curve using the mean absorbance value of each patient specimen. If samples in an initial analysis give NSE levels above the concentration of calibrator E, it is necessary to dilute the sample 1/10 with normal human serum in order to obtain accurate results. The result should then be calculated according to the following procedure:

Dilution 1/10:  $10 \times ([NSE]_{\text{Diluted sample}} - (0.9 \times [NSE]_{\text{Normal human serum}}))$

**Example of results**

| Specimen     | Calibrator values | Mean abs value (A) | NSE µg/L |
|--------------|-------------------|--------------------|----------|
| Calibrator A | 0 µg/L            | 0.037              |          |
| Calibrator B | 7.5 µg/L          | 0.238              |          |
| Calibrator C | 22.9 µg/L         | 0.663              |          |
| Calibrator D | 68.4 µg/L         | 1.688              |          |
| Calibrator E | 138.0 µg/L        | 2.720              |          |
| Specimen 1   |                   | 0.518              | 17.5     |
| Specimen 2   |                   | 1.474              | 57.8     |



*Example, do not use this curve to determine assay results. The exact NSE concentration is indicated on the QC data sheet.*



## 9 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The level of NSE cannot be used as absolute evidence for the presence or absence of malignant disease and the NSE test should not be used in cancer screening. The results of the test should be interpreted only in conjunction with other investigations and procedures in the diagnosis of disease and the NSE test should not replace any established clinical examination.

- Elevated NSE values not due to tumours may occur in dialysis patients and patients with leukaemic diseases.
- Serum should not contain visible haemolysis (the absorbance at 500 nm for non-turbid sample should not exceed 0.3) since erythrocytes contain significant amounts of NSE (7). Prolonged storage of whole blood can cause release of NSE from the blood cells.
- Anti-reagent antibodies (human anti-mouse antibody (HAMA) or heterophilic antibodies) in the patient sample may occasionally interfere with the assay, even though specific blocking agents are included in the buffer.

## 10 EXPECTED VALUES

The NSE ELISA was used to measure NSE antigen levels in specimens from 495 apparently healthy donors. In this study 97.5% of the subjects had a NSE concentration at or below 10.5 µg/L and 95% of the subjects had a NSE concentration at or below 9.9 µg/L. Median serum level was 6.5 µg/L.

It is recommended that each laboratory establish its own normal range to account for such local environmental factors as diet, climate, living conditions, patient selection, etc.

## 11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1 Precision

Total precision was determined according to NCCLS guideline EP5-A (8) using four levels of frozen pooled human serum containing added NSE. Each sample was randomly pipetted in duplicates and analysed twice each day over 20 days. The analyses were undertaken during a period of 40 months, by ≥ three different technicians and using 20 different NSE ELISA kit batches.

| Sample | Replicates | Mean µg/L | Within-run SD (µg/L) | Within-run CV % | Between-day SD (µg/L) | Between-day CV % |
|--------|------------|-----------|----------------------|-----------------|-----------------------|------------------|
| NSE 1  | 80         | 10.3      | 0.24                 | 2.3             | 0.57                  | 5.5              |
| NSE 2  | 80         | 23.7      | 0.82                 | 3.5             | 0.97                  | 4.1              |
| NSE 3  | 80         | 48.2      | 1.02                 | 2.1             | 1.93                  | 4.0              |
| NSE 4  | 80         | 92.7      | 1.60                 | 1.7             | 3.44                  | 3.7              |

### 11.2 Detection limit

The detection limit of the NSE ELISA assay is < 1 µg/L defined as the concentration corresponding to the mean of the absorbance values for the NSE Calibrator A plus 2 standard deviations according to the formula:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL A}}{\text{OD CAL B} - \text{OD CAL A}} \times [\text{CAL B}] \mu\text{g/L}$$

### 11.3 Hook effect

No hook effect has been noticed for NSE concentrations up to 200 000 µg/L.

### 11.4 Linearity

Patient samples were diluted with normal serum and analysed.

The obtained values were in the range 93 – 101 % of the expected values.

### 11.5 Specificity

The monoclonal antibodies used are specific for the  $\gamma$ -subunit of enolase. No measurable cross-reactions with other enolase have been observed.

The NCCLS guideline EP7-P (9) was followed to determine possible sources of interference. The following substances and concentrations were tested and found not to interfere with the test.

#### **Concentration with no significant ( $\pm$ 10%) interference**

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| Lipemia (Intralipid®)   | 10 mg/mL  |
| Bilirubin, unconjugated | 0.6 mg/mL |

### 12 WARRANTY

The performance data presented here were obtained using the assay procedure indicated. Any change or modification of the procedure not recommended by DEMEDITEC may affect the results, in which event DEMEDITEC disclaims all warranties expressed, implied or statutory including the implied warranty of merchantability and fitness for use.

### 1 VERWENDUNGSZWECK

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von NSE (Neuron Specific Enolase) in humanem Serum.

### 2 KLINISCHE BEDEUTUNG

Die glycolytische Enzym Enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase, EC 4.2.1.11) existiert in Form von unterschiedlichen dimeren Isoenzymen ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$  and  $\gamma\gamma$ ) bestehend aus drei verschiedenen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Die  $\gamma$  Untereinheit wird sowohl in einem homologen  $\gamma\gamma$ -, als auch in einem heterologen  $\alpha\gamma$ -Isoenzym gefunden und ist bekannt als Neuron spezifische Enolase (NSE). Der monoclonale Antikörper, verwendet in dem NSE ELISA, bindet an die  $\gamma$ -Untereinheit des Enzymes und bestimmt daher beides, die  $\gamma\gamma$ - und die  $\alpha\gamma$ - Form (1).

Die NSE Werte in gesunden Individuen und bei gutartigen Erkrankungen sind niedrig. Erhöhte Werte werden häufig bei Patienten mit bösartigen Tumoren mit neuroendokriner Differentiation, speziell kleinem Zell-Lungenkrebs (SCLC) (2) und Neuroblastoma (3) gefunden.

Die quantitative Bestimmung von NSE in Serum ist sinnvoll bei Patienten mit vorhandenem oder vermutetem SCLC und Neuroblastoma, zur Bestätigung der Diagnose und zur Therapieüberwachung.

### 3 TESTPRINZIP

Der NSE ELISA ist ein Festphasen Enzymimmunoassay basierend auf zwei monoclonalen Antikörpern (gewonnen aus der Maus) gerichtet gegen zwei separate Antigen determinanten des NSE Moleküls. Die monoclonalen Antikörper binden an die  $\gamma$ -Untereinheit des Enzymes und detektieren somit beide, die  $\gamma\gamma$  und die  $\alpha\gamma$  Form. Calibrators und Patientenproben werden zusammen mit biotiniliertem Anti-NSE Mab E21 und POD gelabeltem Anti-NSE Mab E17 in Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Nach dem Waschen wird zu jedem Well TMB Substrat zugegeben und wieder inkubiert. Ist das Antigen in der Probe enthalten entwickelt sich eine blaue Färbung der Lösung.

Die Intensität der Blaufärbung ist proportional zur Menge an Antigen in den Proben. Die Farbintensität wird mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegerätes bei 620 nm (oder optional bei 405 nm nach Zugabe von Stop Lösung) gemessen. Standardkurven werden für jeden Test in der Form gezeichnet, dass die Absorptionswerte gegen die Konzentrationen der Calibrators aufgetragen werden.

Die NSE Konzentrationen der Patientenproben können dann der Standardkurve entnommen werden.

#### 4 REAGENZIEN

- Der NSE ELISA Kit beinhaltet ausreichend Reagenzien für 96 Bestimmungen.
  - Das Verfallsdatum finden Sie auf dem Außenetikett der Kitbox.
  - Verwenden Sie keine Reagenzien nach dem Verfallsdatum.
  - Mischen Sie nicht die Reagenzien von unterschiedlichen Kit Chargen.
  - Bewahren Sie den Kit bei 2-8 °C auf.
  - Nicht einfrieren.
1. **Microtiterplate [SORB MT]** 1 Platte; 2 - 8 °C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum. 12 x 8 Wells beschichtet mit Streptavidin. Nicht benötigte Streifen nach dem Öffner sofort wieder in den Aluminiumbeutel mit Trockenmittel geben und diesen sorgfältig verschließen, damit keine Feuchtigkeit eindringt.
  2. **NSE Kalibratoren [CAL]** 5 Fläschchen, lyoph. je 0.75 mL; 4 Wochen bei 2 - 8 °C; 3 Monate at -20 °C. Die lyophilisierten Kalibratoren enthalten humanes NSE in einer Proteinmatrix mit 0.01 % eines azidfreien Konservierungsmittels. Vor Gebrauch mit 0,75 mL destilliertem Wasser auflösen. **Achtung:** Die exakten NSE Konzentrationen finden Sie auf dem QC Datenblatt.
  3. **Biotin Anti-NSE [BIOTIN Ab]** 1 x 15 mL; 2 - 8 °C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum. Biotin Anti-NSE, monoklonaler Maus-Antikörper, etwa 2 µg/mL. Enthält Phosphatpuffer (pH 7.1), BSA, Blockierungsreagenz, inerte blaue Farbe und 0.01 % Methylisothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Vor Gebrauch mit HRP Anti-NSE-Tracer mischen.
  4. **Tracer, HRP Anti-NSE [CONJ]** 1 x 0.75 mL; 2 - 8 °C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum. Stammlösung mit HRP Anti-NSE-Antikörper (monoklonal), etwa 40 µg/mL. Vor Gebrauch mit Biotin Anti-NSE mischen. Enthält 0.02 % Methylisothiazolon (MIT), 0.02 % Bromonitrodioxane und 20 ppm Proclin 300 als Konservierungsmittel.
  5. **TMB HRP-Substrate [SUB TMB]** 1 x 12 mL; 2 - 8 °C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum. *Gebrauchsfertig*. Enthält gepuffertes Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB).
  6. **Stop Solution [STOP SOLN]** 1 x 15 mL; 2 - 8 °C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum. *Gebrauchsfertig*. Enthält 0.12 M HCl.
  7. **Wash Concentrate [BUF WASH 25x]** 1 x 50 mL; 2 - 8 °C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum. Vor Gebrauch 25-fach mit Wasser verdünnen. Eine Tris-HCl gepufferte Salzlösung mit Tween 20. Enthält Germall II als Konservierungsmittel.

#### 5 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

##### Für In-vitro-Diagnostik

- Nur für geschultes Fachpersonal.
- Bitte beachten Sie die Vorschriften zur Laborsicherheit in der Publikation Nr. (CDC) 88-8395 des US Department of Health and Human Services (Bethesda, MD, USA) oder andere gleichwertige regionale oder nationale Bestimmungen.
- Alle Patientenproben gelten als potenziell infektiös und sind entsprechend zu handhaben.
- Befolgen Sie die lokalen Richtlinien zur Entsorgung von anfallenden Abfallstoffen.

##### Achtung

Das zur Herstellung der Reagenzien aus humaner Quelle verwendete Material wurde auf HIV-1/2-Antikörper, HCV-Antikörper und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) getestet und als nicht reaktiv befunden. Da es keine Methode gibt, mit der das Vorliegen von durch Blut übertragenen Krankheiten vollkommen ausgeschlossen werden kann, sollten der Umgang mit Reagenzien aus humaner Quelle und deren Entsorgung so erfolgen, als handele es sich um potenziell infektiöses Material.

#### 6 PROBENVORBEREITUNG

Der NSE ELISA ist geeignet für Serumproben. Das Blut wird durch Venenpunktion entnommen und das Serum wird mit Hilfe der gängigen Verfahren gewonnen. (Abtrennung des Serums innerhalb von 60 Minuten.). Längere Lagerung des Vollblutes kann zum Austreten von NSE aus den Blutzellen führen. Eine Verwendung von Plasma ist nicht zu empfehlen, da signifikante Mengen an NSE aus den Thrombozyten austreten können. Sollten NSE Konzentrationen oberhalb des Meßbereiches erwartet werden empfehlen wir die Proben mit normalem Humanserum vor dem Test zu verdünnen. Bitte beachten: Die Proben, welche zur Verdünnung verwendet werden, sollten ebenfalls getestet werden, um endogene NSE Konzentrationen zu bestimmen. Die Proben können bei 2 °C – 8 °C für 24 Cal darüber hinaus bei ≤ -70 °C aufbewahrt werden. Bitte nur einmal einfrieren. Gefrorene Proben s vor dem Test auf Raumtemperatur bringen.

## 7 DURCHFÜHRUNG

### 7.1 Erforderliche Materialien, die nicht im Kit enthalten sind

1. Mikrotiterplatten-Schüttler 700-1100 U/min
2. Mikrotiterplatten-Waschgerät oder 8-Kanal-Pipette.
3. Mikrotiterplattenleser (620 nm und/oder 405 nm)
4. Präzisionspipetten mit auswechselbaren Spitzen
5. Distilliertes oder deionisiertes Wasser

### 7.2 Vorbereitung der Reagenzien

**NSE Kalibratoren** 4 Wochen bei 2 - 8 °C; 3 Monate bei – 20 °C. Pipettieren Sie exakt 0.75 mL destilliertes Wasser in jedes Standardfläschchen und mischen Sie vorsichtig. Lassen Sie die rekonstituierten Lösungen für 15 Minuten stehen. **Bitte beachten:** Die Standardkonzentrationen finden Sie auf den Fläschchenetiketten und diese sollten zur Erstellung der Standardkurve verwendet werden.

**Wash Solution** 2 Wochen bei 2 - 25 °C; im verschlossenen Behälter. Geben Sie 50 mL der konzentrierten Waschlösung in ein sauberes Gefäß und verdünnen Sie 25-fach durch Zugabe von 1200 mL destilliertem Wasser.

**Antibody Solution** 3 Wochen bei 2 - 8 °C. Geben Sie 50 mL der konzentrierten Waschlösung in ein sauberes Gefäß und verdünnen Sie 25-fach durch Zugabe von 1200 mL destilliertem Wasser.

| Anzahl der Streifen | HRP Anti-NSE Tracer (µL) | Biotin Anti-NSE (mL) |
|---------------------|--------------------------|----------------------|
| 1                   | 50                       | 1                    |
| 2                   | 100                      | 2                    |
| 3                   | 150                      | 3                    |
| 4                   | 200                      | 4                    |
| 5                   | 250                      | 5                    |
| 6                   | 300                      | 6                    |
| 7                   | 350                      | 7                    |
| 8                   | 400                      | 8                    |
| 9                   | 450                      | 9                    |
| 10                  | 500                      | 10                   |
| 11                  | 550                      | 11                   |
| 12                  | 600                      | 12                   |

Bitte verwenden Sie nur saubere Plastik oder Glasgefäße zur Herstellung der Inkubationslösung.

**Alternative:** Füllen Sie den Inhalt der Tracer Stock Lösung in die Flasche mit Biotin Anti NSE und mischen Sie vorsichtig. Stellen Sie sicher, dass die gesamte Tracer Stock Lösung in das Biotin Anti NSE überführt wird.

**Bitte beachten:** Der verdünnte Tracer ist für 3 Wochen bei 2 - 8 °C stabil. Setzen Sie bitte nicht mehr Tracer an, als Sie innerhalb dieses Zeitraums verwenden.

### 7.3 Testdurchführung

Es wird empfohlen Doppelbestimmungen für Kalibratoren und Proben durchzuführen.

Eine Standardkurve sollte bei jedem Ansatz bestimmt werden.

Alle Reagenzien und Proben sollten vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) gebracht werden.

1. Beginnen Sie mit der Vorbereitung der NSE-Kalibratoren, Waschlösung und Inkubationslösung. Es ist sehr wichtig saubere Gefäße zu verwenden und der Anleitung genau zu folgen.
2. Entnehmen Sie die benötigten Strips aus der Verpackung und setzen Sie sie in den Plattenrahmen ein. (Nicht benötigte Strips bitte in dem Verschlussenen Beutel belassen und bei 2 - 8 °C aufbewahren.) Den Strip zuerst mit Waschlösung einmal waschen. Bitte waschen Sie nicht mehr Strips, als Sie in 30 Min. abarbeiten können.
3. Pipettieren Sie 25 µL der NSE-Kalibratoren (Cal) und Proben in die Vertiefungen, nach folgendem Schema:

|          | 1     | 2         | 3         | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|----------|-------|-----------|-----------|---|---|---|---|---|
| <b>A</b> | Cal A | Cal E     | Patient 4 |   |   |   |   |   |
| <b>B</b> | Cal A | Cal E     | etc.      |   |   |   |   |   |
| <b>C</b> | Cal B | Patient 1 |           |   |   |   |   |   |
| <b>D</b> | Cal B | Patient 1 |           |   |   |   |   |   |
| <b>E</b> | Cal C | Patient 2 |           |   |   |   |   |   |
| <b>F</b> | Cal C | Patient 2 |           |   |   |   |   |   |
| <b>G</b> | Cal D | Patient 3 |           |   |   |   |   |   |
| <b>H</b> | Cal D | Patient 3 |           |   |   |   |   |   |

4. Pipettieren Sie 100 µL der Antibody Solution (Tracer) zu jedem Well mit Hilfe einer Präzisionspipette oder einer 8-Kanal-100 µL Pipette. Verhindern Sie eine Verschleppung indem Sie die Pipette oberhalb des Wells ansetzen und vermeiden Sie das Berühren der Pipette mit den Wells oder der Flüssigkeit in dem Wells.
5. Inkubieren Sie für 1 Stunde. (± 10 Min.) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) bei konstantem Schütteln der Platte auf einem Schüttler.
6. Nach der Inkubation 6-mal mit Waschlösung waschen.
7. Geben Sie 100 µL des TMB HRP-Substrates zu jedem Well, verwenden Sie dazu die gleiche Pipettierschrittfolge wie in Punkt 4. Das Pipettieren der TMB Lösung sollte so schnell wie möglich erfolgen und die Zeitspanne zwischen dem ersten und letzten Well sollte 5 Minuten nicht überschreiten.
8. Inkubieren Sie 30 Min. (± 5 Min.) bei Raumtemperatur mit konstantem Schütteln. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung.
9. Messen Sie direkt die Absorption bei 620 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät.

#### Optional:

Sollten Sie nicht über ein Mikrotiterplattenlesegerät verfügen, welches die Möglichkeit bietet bei 620 nm zu messen, fahren Sie nach der 30 Minuten Inkubation der TMB Lösung mit Punkt 10 fort.

10. Pipettieren Sie 100 µL der Stopplösung und mischen Sie. Danach messen Sie die Absorption bei 405 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät innerhalb von 15 min.

**8 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**

Erstellen Sie eine Standardkurve, indem Sie die durchschnittliche Extinktion der Referenzstandards gegen die entsprechende Konzentration in µg/L auftragen. Die NSE-Konzentration der Patientenproben wird durch Interpolation aus der Standardkurve ermittelt bzw. per Computer berechnet.

Für die automatische Berechnung der Ergebnisse verwenden Sie bitte eine der nachfolgenden Auswertemethoden:

- "Cubic spline curve fit" Methode. (Kalibrator A sollte in die Kurve integriert werden mit 0 µg/L.)
- „Spline smoothed curve fit“ Methode (Kalibrator A sollte als BLANK verwendet werden)
- Interpolation mit „Punkt-zu-Punkt“ Auswertung (Kalibrator A sollte in die Kurve integriert werden mit 0 µg/L.)
- „Quadratic curve fit“ Methode (Kalibrator A sollte in die Kurve integriert werden mit 0 µg/L..)

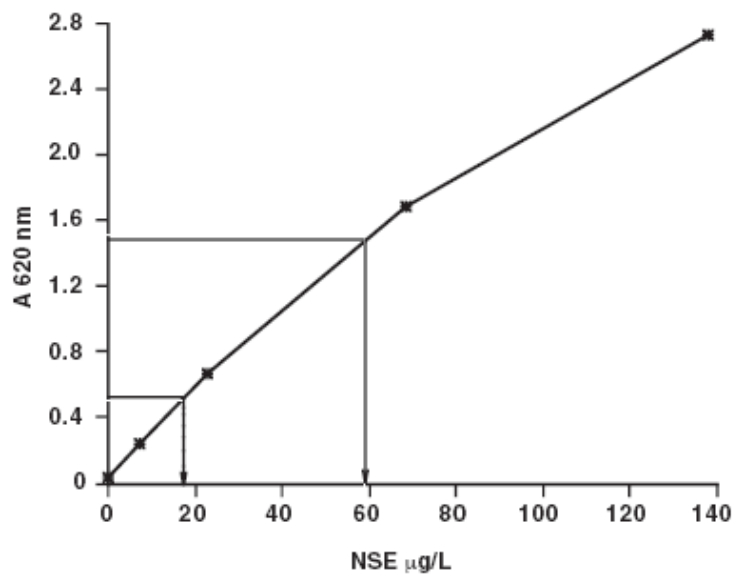
**Achtung:** 4-Parameter-oder lineare Regressionsmethoden sollten nicht angewendet werden.

Ergaben Proben in früheren Tests NSE-Werte oberhalb von Kalibrator E, ist es notwendig die Proben 1/10 mit normalem Humanserum zu verdünnen. Das Ergebnis sollte dann wie folgt berechnet werden:

Verdünnung 1/10:  $10 \times ([NSE]_{\text{Verdünnte Probe}} - (0.9 \times [NSE]_{\text{Normales Humanserum}}))$

**Beispiel einer Standardkurve** (Verwenden Sie diese Werte nicht zur Erstellung Ihrer Standardkurve!)

| Probe        | Kalibratorwert | OD-Mittelwert | NSE µg/L |
|--------------|----------------|---------------|----------|
| Calibrator A | 0 µg/L         | 0.037         |          |
| Calibrator B | 7.5 µg/L       | 0.238         |          |
| Calibrator C | 22.9 µg/L      | 0.663         |          |
| Calibrator D | 68.4 µg/L      | 1.688         |          |
| Calibrator E | 138.0 µg/L     | 2.720         |          |
| Probe 1      |                | 0.518         | 17.5     |
| Probe 2      |                | 1.474         | 57.8     |



## 9 AUSSAGEFÄHIGKEIT DES TESTS

Aus der NSE Konzentration ergibt sich keine absolut eindeutige Aussage über das Vorhandensein eines Tumors, deshalb sollte dieser Wert nur in Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer diagnostischer Methoden interpretiert werden.

Bei Dialyse Patienten oder Patienten mit Leukämischen Erkrankungen zeigen sich erhöhte NSE Konzentrationen, welche unabhängig von Tumoren sein können.

Sichtbar hämolytische Proben sollten nicht eingesetzt werden da Erythrozyten signifikante Mengen an NSE enthalten. Bei längerer Lagerung des Vollblutes kann ein Austreten von NSE aus den Blutzellen vorkommen.

## 10 ZU ERWARTENDE WERTE

Im Rahmen einer Studie wurde die NSE-Antigenkonzentration in Proben aus 495 offensichtlich gesunden Blutspendern mit dem NSE ELISA gemessen. 97.5% der Personen wiesen in dieser Studie NSE-Werte von bzw. unter 10,5 µg/L auf und 95% der Personen NSE-Werte von bzw. unter 9,9 µg/L. Der mittlere Serumwert lag bei 6,5 µg/L.

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalbereich je nach Patientenauswahl und verwendeten Probeentnahmeverfahren definiert.

Weitere Informationen zum Test entnehmen Sie bitte der englischen Anleitung.



## 1 USO PREVISTO

Il kit ELISA NSE è finalizzato alla determinazione quantitativa dell'Enolasi Neurone Specifica (NSE) in siero umano

## 2 INTRODUZIONE

L'enzima glicolitico enolasi (2-fosfo-D-glicerato idrolasi, EC 4.2.1.11) esiste in forma di isoenzimi dimerici ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$ , e  $\gamma\gamma$ ) composti da tre distinte subunità  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . L'unità  $\gamma$  si trova sia in forma omologa  $\gamma\gamma$  che in forma di isoenzima eterologo  $\alpha\gamma$  noto come Enolasi Neurone Specifica (NSE).

L'anticorpo monoclonale usato nel kit NSE EIA si lega alla subunità  $\gamma$  dell'enzima e di conseguenza può evidenziare sia la forma  $\gamma\gamma$  che quella  $\alpha\gamma$  (1,2). La concentrazione di NSE in siero è bassa nei soggetti sani ed in quelli con patologia benigna. Concentrazioni elevate sono comuni in pazienti con tumori maligni a differenziazione neuroendocrina, specialmente nei tumori polmonari di tipo SCLC (Small Cell Lung Cancer) (3) e nei neuroblastomi (4). La determinazione quantitativa di NSE nel siero può essere utile nella gestione dei pazienti con SCLC sospetto o diagnosticato o con neuroblastoma, per confermare la diagnosi, monitorare gli effetti della terapia ed aiutare nell'evidenziare la ricorrenza della malattia (5,6).

## 3 PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il metodo utilizzato da NSE EIA è un dosaggio immunoenzimatico non competitivo in fase solida, basato su due anticorpi monoclonali (originati in topi) specifici per due diversi determinanti antigenici della molecola di NSE. Gli anticorpi monoclonali (Mab) usati legano la subunità  $\gamma$  e pertanto evidenziano sia la forma  $\gamma\gamma$  che quella  $\alpha\gamma$ . I calibratori ed i campioni dei pazienti vengono incubati in pozzetti sensibilizzati con streptavidina unitamente all'anticorpo monoclonale biotinilato Anti-NSE Mab 21 ed all' anticorpo monoclonale Anti-NSE Mab 17 marcato con Perossidasi di rafano (HRP). Dopo il lavaggio il reagente tamponato Substrato/Cromogeno (perossido d'idrogeno e 3,3',5 tetrametilbenzidina) viene dispensato in tutti i pozzetti attivando in tal modo la reazione enzimatica. Durante la reazione enzimatica si sviluppa una

colorazione blu nel caso l' antigene sia presente. L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di NSE presente nei campioni. L'intensità del colore viene misurata per mezzo di un lettore spettrofotometrico di micropiastre alla lunghezza d'onda di 620 nm (oppure a 405 nm dopo l'aggiunta del Reattivo Bloccante). Le curve di calibrazione vengono estrapolate dai valori di assorbanza ottenuti alla concentrazione di ogni calibratore e su di esse viene misurata la concentrazione di NSE presente nei campioni..

#### 4 REATTIVI

- Ogni kit NSE EIA contiene reattivi sufficienti per eseguire 96 dosaggi.
- La data di scadenza è specificata sull'etichetta posta sull'esterno della scatola del kit.
- Non usare il prodotto oltre la data di scadenza.
- Non mescolare reagenti provenienti da kit di lotti diversi.
- Conservare i kit a 2 - 8 °C. Non congelare.
- I reattivi una volta aperti sono stabili alle condizioni descritte nella tabella che segue, a condizione che non siano contaminati, vengano conservati nei flaconi originali opportunamente chiusi e maneggiati come prescritto. Riportare i reattivi a 2 - 8 °C immediatamente dopo l'uso.

1. **Micropiastra sensibilizzata [SORB MT]** 1 piastra; 2 - 8 °C fino alla scadenza riportata sulla piastra. 12 x 8 pozzetti a frattura predeterminata sensibilizzati con streptavidina. Dopo l'apertura rimettere immediatamente le strip non usate nell'apposita busta di alluminio contenente l'essiccatore e richiudere accuratamente in modo tale da conservare in ambiente asciutto.
2. **Standards NSE [CAL]** 5 flaconi, liofilizzati, 0.75 mL ciascuno. 4 settimane a 2 - 8 °C / 3 mesi a - 20 °C. Gli standards liofilizzati contengono NSE di origine umana in matrice proteica con 0,01% di conservante non a base di azide. Ricostituire con 0.75 mL H<sub>2</sub>O distillata prima dell'uso.  
**NOTA:** l'esatta concentrazione di NSE varia da lotto a lotto ed è indicata sull'QC data sheet.
3. **Biotina Anti-NSE [BIOTIN Ab]** 1 x 15 mL; 2 - 8 °C fino alla scadenza riportata sul flacone. Biotina Anti NSE anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 2 µg/mL. Contiene tampone fosfato (pH 7.1), sieroalbumina bovina, agenti bloccanti, un colorante blu inerte e lo 0.01% di metil-isotiazolone (MIT) come conservante. *Da mescolare col Tracciante, HRP Anti-NSE, prima dell'uso.*
4. **Tracciante, HRP Anti-NSE [CONJ]** 1 x 0.75 mL; 2 - 8 °C fino alla scadenza riportata sul flacone. Soluzione stock di HRP Anti-NSE anticorpo monoclonale murino, approssimativamente 40 µg/mL. *Mescolare con Biotina Anti-NSE prima dell'uso.* Contiene lo 0,02% di metil-isotiazolone (MIT), 0,02% bromonitrodiossano e 20 ppm di Proclin come conservanti.
5. **TMB HRP-Substrato [SUB TMB]** 1 x 12 mL; 2 - 8 °C fino alla scadenza riportata sul flacone. *Pronta all'uso.* Contiene perossido di idrogeno in tampone e tetrametilbenzidina 3,3',5,5' (TMB).  
**Indicazioni di instabilità:** La soluzione TMB HRP-substrato deve essere incolore o al massimo leggermente azzurra. Una intensa colorazione blu significa che il reattivo è stato contaminato e pertanto non deve essere usato.
6. **Reattivo Bloccante [STOP SOLN]** 1 x 15 mL; 2 - 8 °C fino alla scadenza riportata sul flacone. *Pronta all'uso.* Contiene 0.12 M HCl.
7. **Tampone Lavaggio Concentrato [BUF WASH 25x]** 1 x 50 mL; 2 - 8 °C fino alla scadenza riportata sul flacone. *Diluire con H<sub>2</sub>O distillata x25 prima dell'uso.* Soluzione tampone Tris-HCl con Tween 20. Contiene Germall II come conservante.

#### 5 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

##### Per uso diagnostico in vitro

- Solamente per uso professionale
- Come riferimento si consiglia la pubblicazione No. (CDC) 88-8395 del US Department of Health and Human Service o qualsiasi altro regolamento locale o nazionale relativo alle Norme di Sicurezza da seguire nei Laboratori Diagnostici
- Maneggiare i campioni dei pazienti come potenzialmente infetti
- Seguire le normative vigenti relative all'eliminazione del materiale usato

##### Precauzioni

Le unità di sangue usate nella preparazione dei reagenti sono state testate e trovate Non Reattive per l'anticorpo anti-HIV 1 e 2, per l'anticorpo anti-HCV e l'antigene di superficie dell'Epatite B (HbsAg). Tuttavia poichè nessun metodo diagnostico è in grado di escludere completamente la possibilità di trasmissione di infezioni attraverso il sangue si consiglia di maneggiare questi reattivi come potenzialmente infettivi.

## 6 PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il kit NSE EIA richiede l'uso di campioni di siero umano. Prelevare il sangue per via venosa e separare il siero seguendo le normali procedure. Il siero deve essere separato dal coagulo entro 60 minuti dal prelievo per evitare la fuoriuscita di NSE dalle cellule del sangue. Non usare campioni emolizzati. Non si consiglia l'uso del plasma poichè rilevanti quantità di NSE potrebbero essere rilasciate dalle piastrine. I campioni si possono conservare a 2 - 8 °C per 24 ore. Per periodi più lunghi conservare i campioni ad almeno -70 °C. I campioni non devono essere conservati in congelatori a scongelamento automatico. Evitare il scongelamento ed il ricongelamento ripetuto dei campioni prima del dosaggio. Effettuare il scongelamento lentamente fino al raggiungimento della temperatura ambiente mescolando ACCURATAMENTE mediante oscillazione della provetta molte volte prima del dosaggio.

I campioni contenenti grosse particole devono essere centrifugati a 10.000 rpm per 10 minuti prima dell'uso per eliminare qualsiasi particola che può essere stata prodotta nel processo di scongelamento. Dosare i campioni scongelati entro un'ora.

## 7 PROCEDIMENTO OPERATIVO

### 7.1 Materiali richiesti per il dosaggio ma non forniti con il kit

#### 1. Agitatore di micropiastre

L'agitazione va effettuata tra il medio e il vigoroso, approssimativamente a 700-1100 oscillazioni/min.

#### 2. Lavatore di micropiastre

Lavatore di micropiastre automatico in grado di effettuare 1 e 6 cicli di lavaggio con un volume di riempimento minimo di 350 µL/pozzetto/ciclo di lavaggio. Nel caso non venga usato un lavatore di micropiastre automatico si consiglia una pipetta a 8 canali con puntali in plastica monouso per la dispensazione di 350 µL.

#### 3. Spettrofotometro per micropiastre

Lettoresspettrofotometrico con lunghezza d'onda a 620 nm e/o 405 nm ed un intervallo di assorbanza da 0 a 3.0.

#### 4. Pipette di precisione

Con puntali a gettare in grado di dispensare microlitri. Utili ma non indispensabili per dispensare 100 µL sono le pipette a 8 canali o le pipette graduate con puntali di plastica a gettare.

#### 5. Acqua distillata o deionizzata

Per ricostituire i calibratori NSE e per la preparazione della soluzione di lavaggio diluita

## 7.2 Note

1. La comprensione globale di questo libretto d'istruzioni garantisce l'uso appropriato del kit NSE EIA. I reattivi forniti col kit devono essere usati come una unità integrale. Non mescolare reattivi di kits con differente numero di lotto. Non usare i reattivi dopo la data di scadenza indicata sull'esterno della scatola del kit
2. Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Il dosaggio deve essere effettuato ad una temperatura compresa tra 20-25°C per ottenere risultati accurati. I campioni congelati devono essere gentilmente ma accuratamente mescolati dopo il scongelamento.
3. Prima di dispensare i calibratori ed i campioni dei pazienti è consigliabile segnare le strip in modo tale da poterle facilmente identificare durante e dopo il dosaggio.
4. Un lavaggio efficace per la separazione dei reagenti legati e non legati dal complesso antigene-anticorpo adsorbito in fase solida è uno dei requisiti più importanti in un test EIA. Per garantire un lavaggio efficiente, occorre accertare che: in ogni ciclo di lavaggio tutti i pozzetti siano completamente riempiti fino al bordo superiore dalla soluzione di lavaggio; la soluzione di lavaggio sia dispensata con un flusso appropriato; l'aspirazione del liquido nei pozzetti, tra e dopo ogni ciclo di lavaggio, sia completa e che i pozzetti siano perfettamente asciutti. Nel caso in cui rimanga del liquido residuo sul fondo dei pozzetti, capovolgere la micropiastra, premendola con cura contro della carta assorbente.
  - Lavaggio automatico: Seguire le istruzioni del produttore per una accurata pulizia e manutenzione ed effettuare il numero richiesto di cicli di lavaggio prima e dopo ogni incubazione. Si raccomanda vivamente di utilizzare la modalità di trattamento delle strip e la modalità di lavaggio overflow con un volume di dispensazione di 800 µL. Il sistema di lavaggio ed aspirazione non va lasciato per lunghi periodi a contatto della soluzione di lavaggio, altrimenti si rischia l'intasamento degli ugelli e quindi una dispensazione e un'aspirazione insufficienti.
5. Il TMB HRP-Substrato è molto sensibile alla contaminazione. Per garantire una stabilità ottimale del TMB HRP-Substrato versare la quantità necessaria dal flacone in un contenitore accuratamente pulito o preferibilmente in una vaschetta di plastica monouso in modo da evitare la contaminazione del reattivo. Usare puntali di plastica puliti monouso (o puntali di pipetta graduata).
6. Assicurarsi di usare pipette con puntali di plastica monouso ed un'adeguata tecnica di pipettamento manipolando campioni e reattivi. Tenere il puntale della pipetta leggermente al di sopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la plastica della strip o la superficie del liquido per non provocare contaminazione fra i pozzetti (carry over). Un'adeguata tecnica di pipettamento è particolarmente importante quando si maneggia il TMB HRP –Substrato.

### 7.3 Preparazione dei reagenti

#### NSE Calibratori

4 settimane a 2 - 8 °C; 3 mesi at -20 °C; Aggiungere esattamente 0.75 mL di acqua distillate ad ogni flacone e mescolare gentilmente. Attendere almeno 15 minuti per una completa ricostituzione.

**NOTA:** la concentrazione dei calibratori è riportata sulle etichette e deve essere usata per il calcolo dei risultati

#### Soluzione Lavaggio

2 settimane a 2 – 25 °C in un contenitore accuratamente chiuso

Versare 50 mL di Tampone Lavaggio concentrato in un contenitore pulito e diluire x25 aggiungendo 1200 mL di acqua distillata o deionizzata ottenendo in tal modo una Soluzione Lavaggio tamponata

#### Soluzione Anticorpi

3 settimane a 2 - 8 °C; Preparare la quantità di Soluzione Anticorpi necessaria mescolando 50 µL di Tracciante. HRP Anti-NSE con 1 mL di Biotina Anti-NSE per strip (vedere la tabella sottostante):

| No. di Strips | Tracciante HRP Anti-NSE (µL) | Biotina Anti-NSE (mL) |
|---------------|------------------------------|-----------------------|
| 1             | 50                           | 1                     |
| 2             | 100                          | 2                     |
| 3             | 150                          | 3                     |
| 4             | 200                          | 4                     |
| 5             | 250                          | 5                     |
| 6             | 300                          | 6                     |
| 7             | 350                          | 7                     |
| 8             | 400                          | 8                     |
| 9             | 450                          | 9                     |
| 10            | 500                          | 10                    |
| 11            | 550                          | 11                    |
| 12            | 600                          | 12                    |

Assicurarsi di usare un contenitore di plastica pulita od un flacone di vetro per preparare la Soluzione Anticorpi

**Alternativa:** Versare il contenuto del flacone del Tracciante, HRP Anti-NSE nel flacone di Biotina Anti-NSE e mescolare gentilmente. Assicurarsi che tutto il contenuto del flacone del Tracciante sia stato effettivamente trasferito in quello della Biotina Anti-NSE.

**NOTA:** la Soluzione Anticorpi è stabile per 3 settimane a 2 - 8 °C. Non preparare più Soluzione Anticorpi del necessario ed assicurarsi che venga conservata correttamente.

#### 7.4 Procedura Analitico

Eseguire in duplicato il dosaggio dei calibratori e dei campioni. Eseguire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica. Tutti i reattivi ed i campioni devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima di eseguire il dosaggio.

1. Iniziare a preparare i calibratori NSE, la Soluzione Lavaggio e la Soluzione Anticorpi. E' importante usare contenitori puliti. Seguire attentamente le istruzioni.
2. Trasferire il numero necessario di strips nell'apposito supporto (riporre le restanti strips nella busta di alluminio contenente un essiccante e sigillare attentamente). Lavare ogni strip una volta con la Soluzione Lavaggio. Non lavare un numero maggiore di strips di quelle che possono essere usate in 30 minuti.
3. Pipettare 25 µL di Calibratori NSE (CAL A, B, C, D, E) e dei campione (sconosciuti) nei pozzetti seguendo lo schema sotto indicato:

|          | 1     | 2       | 3             | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|----------|-------|---------|---------------|---|---|---|---|---|
| <b>A</b> | Cal A | Cal E   | Sconosciuto 4 |   |   |   |   |   |
| <b>B</b> | Cal A | Cal E   | etc.          |   |   |   |   |   |
| <b>C</b> | Cal B | Scon. 1 |               |   |   |   |   |   |
| <b>D</b> | Cal B | Scon. 1 |               |   |   |   |   |   |
| <b>E</b> | Cal C | Scon. 2 |               |   |   |   |   |   |
| <b>F</b> | Cal C | Scon. 2 |               |   |   |   |   |   |
| <b>G</b> | Cal D | Scon. 3 |               |   |   |   |   |   |
| <b>H</b> | Cal D | Scon. 3 |               |   |   |   |   |   |

4. Aggiungere 100 µL di Soluzione Anticorpo ad ogni pozzetto usando una pipetta di precisione (od una pipetta di precisione da 100 µL ad 8 canali) Tenere il puntale della pipetta leggermente al disopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la plastica della strip o la superficie del liquido per evitare la contaminazione (carry over).
5. Incubare la micropiastro per 1 ora ( $\pm$  10 min) a temperatura ambiente (20 - 25 °C) agitando in continuazione con un agitatore per micropiastre.
6. Dopo l'incubazione aspirare il liquido dai pozzetti e lavare 6 volte ogni strip.
7. Aggiungere 100 µL di TMB HRP Substrato ad ogni pozzetto usando la stessa procedura descritta al punto 4. Il TMB HRP Substrato deve essere dispensato nei pozzetti il più velocemente possibile ed il tempo di dispensazione fra il primo e l'ultimo pozzetto non deve superare i 5 minuti.
8. Incubare per 30 min ( $\pm$  5 min) a temperatura ambiente con costante agitazione. Evitare l'esposizione diretta alla luce del sole.
9. Leggere subito l'assorbanza a 620nm usando uno spettrofotometro per micropiastre.

#### Opzione

Se uno spettrofotometro per micropiastre in grado di leggere a 620 nm non è disponibile in laboratorio la densità ottica può essere determinate come descritto al punto 10.

10. Aggiungere 100 µL di Reattivo Bloccante, mescolare e leggere l'assorbanza a 405 nm con uno spettrofotometro per micropiastre entro 15 minuti.

#### 7.5 Intervallo di misura

Il kit NSE ELISA misura concentrazioni comprese fra 1 ed approssimativamente 150 µg/L. Se si devono misurare concentrazioni superiori si raccomanda di diluire i campioni con siero umano normale prima del dosaggio.

**NOTA:** il siero usato per la diluizione deve anche essere testato per determinare la concentrazione endogena di NSE (vedi "Calcolo dei risultati")

#### 7.6 Controllo di Qualità

I sieri di controllo Tumor Marker Livelli 1 e 2 (disponibili separatamente, REF DE4458) sono raccomandati per la validazione delle serie analitiche. Se si ottengono valori al di fuori degli intervalli indicati, bisogna effettuare un controllo completo della funzionalità dei reattivi e del lettore e l'analisi deve essere ripetuta.

#### 7.7 Riferimenti

Poichè non esistono riferimenti ufficiali per l'antigene NSE, i calibratori di NSE EIA vengono definiti sulla base di un set di standard di riferimento interno

## 8 CALCOLO DEI RISULTATI

Se viene usato uno spettrofotometro con procedimento di calcolo programmato consultare il manuale e creare un programma usando le concentrazioni riportate sulle etichette di ogni calibratore NSE. Per il calcolo automatico dei risultati NSE si raccomanda di usare uno dei seguenti metodi:

- Metodo di fitting con curva spline cubica : inserire il calibratore A nella curva col valore 0 µg/L
- Metodo di fitting con curva spline linearizzata. Usare il calibratore 0µg/L come bianco della micropiastra
- Interpolazione con valutazione punto a punto. Il calibratore A deve essere incluso nella curva col valore 0 µg/L
- Metodo di fitting con curva quadratica. Il calibratore A deve essere incluso nella curva col valore 0 µg/L

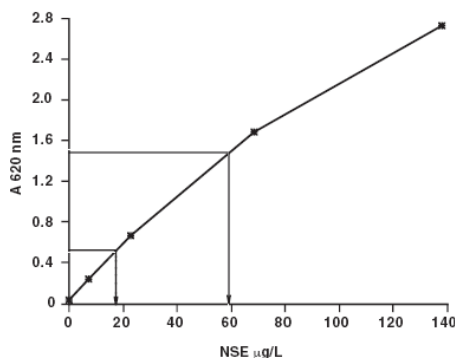
**Nota:** Si sconsiglia di usare metodi di valutazione 4-parametrica o di regressione lineare.

Per la misurazione manuale la curva di calibrazione si traccia riportando su grafico lineare-lineare i valori di assorbanza (A) ottenuti per ogni calibratore NSE contro la corrispondente concentrazione espressa in µg/L (vedi figura). Le concentrazioni ignote di NSE possono quindi essere estrapolate dalla curva di calibrazione usando il valore medio di assorbanza di ogni campione. Se, ad una prima analisi, la concentrazione di NSE è superiore a quella del calibratore E, è necessario diluire il campione 1/10 con siero umano normale per ottenere una risposta accurata. Il risultato viene quindi calcolato con il seguente procedimento:

$$\text{Diluizione 1/10: } 10 \times ([\text{NSE}]_{\text{campione diluito}} - (0.9 \times [\text{NSE}]_{\text{siero umano normale}}))$$

### Esempio di risultati

| campione     | Valori degli Calibrator | Assorbanza media (A) | NSE µg/L |
|--------------|-------------------------|----------------------|----------|
| Calibrator A | 0 µg/L                  | 0.037                |          |
| Calibrator B | 7.5 µg/L                | 0.238                |          |
| Calibrator C | 22.9 µg/L               | 0.663                |          |
| Calibrator D | 68.4 µg/L               | 1.688                |          |
| Calibrator E | 138.0 µg/L              | 2.720                |          |
| Campione 1   |                         | 0.518                | 17.5     |
| campione 2   |                         | 1.474                | 57.8     |



**Esempio.** Esempio, non usare questa curva per determinare risultati reali.  
L'esatta concentrazione di NSE è indicata sull'QC data sheet

## 9 LIMITI DEL DOSAGGIO

La concentrazione di NSE non può essere intesa come evidenza assoluta della presenza o della assenza di patologia tumorale. I risultati del dosaggio sono interpretabili solo unitamente ad altri sistemi di investigazione della diagnosi della malattia ed il dosaggio di NSE non può sostituire altri metodi consolidati di valutazione clinica. Concentrazioni elevate di NSE non dovute a tumori si possono evidenziare in pazienti dializzati ed in pazienti con patologia leucemica. Il siero non deve presentare emolisi visibile (l'assorbanza a 500 nm dei campioni non torbidi non deve superare 0.3) in quanto gli eritrociti contengono quantità notevoli di NSE (7). La lunga conservazione di sangue intero può provocare la fuoriuscita di NSE dalle cellule ematiche. Anticorpi diretti contro agenti contenuti nei reattivi (anticorpi umani anti - topo (HAMA) od anticorpi eterofili) presenti nel siero dei pazienti possono occasionalmente interferire nel dosaggio, anche se specifiche sostanze bloccanti sono contenute nel tampone.

## 10 VALORI ATTESI

Il kit NSE EIA è stato usato per misurare i livelli di antigene NSE in campioni ottenuti da 495 donatori di sangue apparentemente sani. In questo studio, il 97,5 % dei soggetti presentava una concentrazione di NSE pari o inferiore a 10,5 µg/L e il 95 % dei soggetti aveva una concentrazione pari o inferiore a 9,9 µg/L. Il livello sierico mediano era di 6,5 µg/L. Si raccomanda a ogni laboratorio di definire il proprio intervallo di normalità nella popolazione di interesse e le procedure dei raccolta dei campioni da applicare.

## 11 PRESTAZIONI METODOLOGICHE

### 11.1 Precisione

La precisione totale è stata determinata in accordo con NCCLS direttiva EP5-A (8) usando quattro livelli di pool di sieri umani concentrati con aggiunta di NSE. Ogni campione è stato pipettato a caso in duplicato ed analizzato due volte al giorno per 20 giorni consecutivi. I dosaggi sono stati effettuati durante un periodo di 40 mesi da tre differenti operatori usando 20 lotti diversi di kit NSE EIA.

| Campione | Replicati | Media µg/L | Intra saggio SD (µg/L) | Intra saggio CV % | Interdies SD (µg/L) | Interdies CV % |
|----------|-----------|------------|------------------------|-------------------|---------------------|----------------|
| NSE 1    | 80        | 10.3       | 0.24                   | 2.3               | 0.57                | 5.5            |
| NSE 2    | 80        | 23.7       | 0.82                   | 3.5               | 0.97                | 4.1            |
| NSE 3    | 80        | 48.2       | 1.02                   | 2.1               | 1.93                | 4.0            |
| NSE 4    | 80        | 92.7       | 1.60                   | 1.7               | 3.44                | 3.7            |

### 11.2 Limiti del dosaggio

Il limite del dosaggio del kit NSE EIA è < 1 µg/L definito come la concentrazione corrispondente alla media dei valori di assorbanza del calibratore A di NSE più 2 deviazioni standard secondo la formula:

$$\frac{2 \times \text{SD CAL A}}{\text{OD CAL B} - \text{OD CAL A}} \times [\text{CAL B}] \mu\text{g/L}$$

### 11.3 Effetto gancio

Nessun effetto gancio si è verificato fino ad una concentrazione di NSE di 200 000 µg/L.

### 11.4 Linearità

Campioni di pazienti sono stati diluiti con siero umano normale e dosati. I valori ottenuti si posizionavano nell'intervallo 93-101% dei valori attesi

### 11.5 Specificità

Gli anticorpi monoclonali usati sono specifici per la subunità γ dell'enolasi. Nessuna reazione incrociata misurabile con altre enolasi è stata osservata.

La direttiva EP7-P (9) del NCCLS è stata osservata per determinare possibili sorgenti d'interferenza. Le seguenti sostanze e concentrazioni sono state testate e trovate non interferenti nel dosaggio

#### **Concentrazioni con interferenza non significativa(± 10%)**

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| Lipemia (Intralipid®) | 10 mg/mL  |
| Bilirubina, libera    | 0.6 mg/mL |

## 12 AVVERTENZE

I dati di funzionalità presentati sono ottenuti usando il procedimento analitico descritto in questo libretto di istruzioni. Ogni variazione o modifica del procedimento analitico non indicato da DEMEDITEC può alterare i risultati. In questo caso DEMEDITEC non si assume alcuna delle responsabilità espresse, implicite o legali, inclusa la responsabilità implicita della commerciabilità e della proprietà d'uso.



**13 LITERATURE REFERENCES / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA**

1. Paus E. and Nustad K., ( 989) Immunoradiometric Assay for  $\alpha\gamma$ - and  $\gamma\gamma$ -Enolase (Neuron-Specific Enolase), with Use of Monoclonal Antibodies and Magnetizable Polymer Particles. Clin. Chem. 35: 2034 - 2038.
2. Dahlén U., Karlsson B., Nilsson O. and Uhl W., (1995) Development of an Enzyme Immunoassay, NSE-Enzymun Test For Determination of Neuron-Specific Enolase. XXIII International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Montréal, Québec .
3. Cooper E.H., (1999 ) Neuron-specific enolase. The International Journal of Biological Markers 9(4):205-10.
4. Cooper E.H., Pritchard J., Bailey C.C. and Ninane J., (1987) Serum neuronspecific enolase in children's cancer. Br. J. Cancer 56: 65 - 67.
5. Schneider, P. M. et al., (2002) Lung Cancer. In "Tumor markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications" Eds. Diamandis E. P. et al., AACCC Press, Washington pp 287-303.
6. Bonner J. A., Sloan JA., Rowland KM., Klee GG., Kugler JW., Mailliard JA., Wiesenfeld M., Krook JE., Maksymiuk AW., Shaw EG., Marks RS and Perez EA., (2000) Significance of Neuron-specific Enolase Levels before and during Therapy for Small Cell Lung Cancer. Clinical Cancer Research 6: 597-601.
7. Pählman S., Esscher T., Bergvall P. and Odelstad L., (1984) Purification and characterization of human neuron-specific enolase: Radioimmunoassay development. Tumor Biol. 5: 127 - 139.
8. National Committee for Clinical Laboratory Calibrators, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
9. National Committee for Clinical Laboratory Calibrators, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).

**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

| Symbol  | English                            | Deutsch                      | Français                                 | Español                               | Italiano                            |
|---|------------------------------------|------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
|  | Consult instructions for use       | Gebrauchsanweisung beachten  | Consulter les instructions d'utilisation | Consulte las instrucciones de uso     | Consultare le istruzioni per l'uso  |
|  | European Conformity                | CE-Konformitätskennzeichnung | Conformité aux normes européennes        | Conformidad europea                   | Conformità europea                  |
|  | In vitro diagnostic device         | In-vitro-Diagnostikum        | Usage Diagnostic in vitro                | Para uso Diagnóstico in vitro         | Per uso Diagnostica in vitro        |
|  | For research use only              | Nur für Forschungszwecke     | Seulement dans le cadre de recherches    | Sólo para uso en investigación        | Solo a scopo di ricerca             |
|  | Catalogue number                   | Katalog-Nr.                  | Numéro de catalogue                      | Número de catálogo                    | Numero di Catalogo                  |
|  | Lot. No. / Batch code              | Chargen-Nr.                  | Numéro de lot                            | Número de lote                        | Numero di lotto                     |
|  | Contains sufficient for <n> tests/ | Ausreichend für "n" Ansätze  | Contenu suffisant pour "n" tests         | Contenido suficiente para <n> ensayos | Contenuto sufficiente per "n" saggi |
|  | Storage Temperature                | Lagerungstemperatur          | Température de conservation              | Temperatura de conservación           | Temperatura di conservazione        |
|  | Expiration Date                    | Mindesthaltbarkeitsdatum     | Date limite d'utilisation                | Fecha de caducidad                    | Data di scadenza                    |
|  | Legal Manufacturer                 | Hersteller                   | Fabricant                                | Fabricante                            | Fabbricante                         |
| Distributed by  | Distributor                        | Vertreiber                   | Distributeur                             | Distribuidor                          | Distributore                        |
| Content   | Content                            | Inhalt                       | Conditionnement                          | Contenido                             | Contenuto                           |
| Volume/No.  | Volume / No.                       | Volumen/Anzahl               | Volume/Quantité                          | Volumen/Número                        | Volume/Quantità                     |