



DCM073-10  
Ed. 01/2015

## hNSE ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta della hNSE in siero umano

IVD



LOT

Vedi etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO073

### DESTINAZIONE D'USO

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

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

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

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

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

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

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

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

Infine l'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

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

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

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators e Controls (2 flaconi ogni Calibratore e Controllo, liofilizzati, leggere attentamente il paragrafo 6.1)

CAL0	REF DCE002/7306-0
CAL1	REF DCE002/7307-0
CAL2	REF DCE002/7308-0
CAL3	REF DCE002/7309-0
CAL4	REF DCE002/7310-0
Negative Control	REF DCE045/7301-0
Positive Control	REF DCE045/7302-0

2. Incubation Buffer (1 flacone, 50 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7.4, BSA 1 g/L

REF DCE001/1401-0

3. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Anticorpo monoclonale anti hNSE coniugato a

perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/7302-0

4. Coated Microplate (1 micropietra breakable)

Anticorpo monoclonale anti hNSE assorbito sulla micropietra

REF DCE002/7303-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0.15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

#### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

#### 3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

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

### Note

Calibratori e Controlli contengono hNSE in una matrice proteica stabilizzante. Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e

chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit

#### 4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300<sup>R</sup> come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di hNSE comprese nel range CAL 0-CAL 4. **Il valore dei Calibratori è lotto-specifico.**

#### 5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso.

Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.

- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

#### 6. PROCEDIMENTO

##### 6.1. Preparazione di Calibratori e Controlli

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

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

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

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

I Calibratori hanno approssimativamente le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	4	20	50	100

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

##### 6.2. Coniugato diluito.

Preparare immediatamente prima dell'uso.

Aggiungere 20 µL di Conjugate (reattivo 3) a 1 mL di Incubation Buffer (reattivo 2); la quantità da preparare è proporzionale al numero di test. Mescolare delicatamente lasciando almeno 5 minuti su agitatore rotante.

### 6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (50X) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

### 6.4. Preparazione del campione

La determinazione dell'hNSE può essere effettuata su siero umano. Il siero dovrebbe essere separato dal sangue entro 60 minuti per evitare l'incremento dell'hNSE dovuto al rilascio da parte delle cellule ematiche. Non usare campioni emolizzati. Evitare l'uso di plasma poiché quantità significative di hNSE potrebbero essere rilasciate dalle piastrine. I campioni possono essere mantenuti a 2-8°C per 24 ore; per periodi più lunghi conservarli a -20°C. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. Evitare di mantenere i campioni per lunghi periodi a temperatura ambiente.

### 6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente (vedere il paragrafo 6.1 per Calibratori e Controlli).
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controlli	Bianco
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	25 µL		
Campione /Controlli		25 µL	
Conjugato diluito	100 µL	100 µL	
<p>Incubare 1 h a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita.</p> <p><b>Nota importante:</b> ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.</p> <p><b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.</p>			

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22-28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agitare delicatamente la micropiastra.</p> <p>Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.</p>			

## 7. CONTROLLO QUALITA'

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

## 8. RISULTATI

### 8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun Calibratore in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Cubic Spline, Sigmoid Logistic, Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calcolo dei risultati

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

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

I valori sierici di hNSE sono compresi nei seguenti intervalli:

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

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

## 10. PARAMETRI CARATTERISTICI

### 10.1. Specificità

L'anticorpo riconosce specificamente l'enolasi neurone specifica umana.

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

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

### 10.2. Sensibilità

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

### 10.3. Precisione

#### 10.3.1. Intra-assay

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

#### 10.3.2. Inter-assay

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

### 10.4. Correlazione

Il kit Diametra hNSE ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 28 campioni di siero con entrambe i sistemi.

La curva di regressione è:

(Commercial kit) = 1.34\*(Diametra kit) - 0.66

$r^2 = 0.971$

### 10.5. Effeto Hook

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

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

## BIBLIOGRAFIA

- 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.
- 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.
- 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.
- Berger RP, Dulani T, Adelson PD, Leventhal JM, Richichi R, Kochanek PM. *Identification of inflicted traumatic brain injury in well-appearing infants using serum and cerebrospinal markers: a possible screening tool.* Pediatrics. 2006 Feb;117(2):325-32.
- 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.
- 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
- 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.

Ed. 01/2015

DCM073-10

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Calabria 15,  
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)



DCM073-10  
Ed. 01/2015

## hNSE ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of hNSE in human serum

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO073

### INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of hNSE ELISA concentration in human serum.

hNSE ELISA kit is intended for laboratory use only.

### 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  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  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.

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

### 2. PRINCIPLE

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

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

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

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

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators and Controls (2 vials each Calibrator and Control, lyophilized, **please read carefully paragraph 6.1**)

CAL0	REF DCE002/7306-0
CAL1	REF DCE002/7307-0
CAL2	REF DCE002/7308-0
CAL3	REF DCE002/7309-0
CAL4	REF DCE002/7310-0
Negative Control	REF DCE045/7301-0
Positive Control	REF DCE045/7302-0

2. Incubation Buffer (1 vial, 50 mL)  
Phosphate buffer 50 mM pH 7.4, BSA 1 g/L  
REF DCE001/1401-0

3. Conjugate (1 vial, 1 mL)  
Monoclonal anti hNSE antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) REF DCE002/7302-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)  
Monoclonal anti hNSE antibody adsorbed on the microplate REF DCE002/7303-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/L (*avoid any skin contact*)  
REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)  
Sulphuric acid 0.15 mol/L (*avoid any skin contact*)  
REF DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 ml)  
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L REF DCE006-0

#### 3.2. Necessary reagents not supplied

Distilled water.

#### 3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

#### Note

*Calibrators and Controls contain hNSE in a proteic stabilizing matrix solution. Store all reagents between 2-8°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<sup>R</sup> 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of hNSE inside the range CAL 0-CAL 4. **Calibrators value is 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 2-8°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 (22-28°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 lipemic 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 Calibrators and Controls

Reconstitute Calibrators and Controls with 0.75 mL of deionized H<sub>2</sub>O before use.

**Important note: reconstituted Calibrators and Controls are very sensitive to temperature, so you should proceed as follows:**

1. reconstitute Calibrators and Controls 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 Calibrators and Controls.

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

The Calibrators have approximately the following concentrations:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	4	20	50	100

**The right Calibrators concentration for the curve compute are lot specific and are stated on the Calibrators vial labels and on the Certificate of Analysis.**

##### 6.2. Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 20 µL of Conjugate (reagent 3) to 1 mL of Incubation Buffer (reagent 2), 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 2-8°C for at least 30 days.

##### 6.4. Preparation of the Sample

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 2-8°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 (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature (see paragraph 6.1 for Calibrators and Controls).
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	25 µL		
Sample/ Controls		25 µL	
Diluted Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22-28°C) for 1 hour. Remove the contents from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. <b>Important note:</b> 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. <b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22-28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

## 7. QUALITY CONTROL

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

## 8. RESULTS

### 8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbancies (E<sub>m</sub>) corresponding to the single points of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration curve

Plot the values of absorbance (E<sub>m</sub>) of the Calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Cubic Spline, Sigmoid Logistic or Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calculation of Results

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

## 9. REFERENCE VALUES

The serum values are comprised in the following intervals:

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

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

## 10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

### 10.1. Specificity

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

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

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

### 10.2. Sensitivity

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

### 10.3. Precision

#### 10.3.1. Intra-assay

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

#### 10.3.2. Inter-assay

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

### 10.4. Correlation

Diametra hNSE ELISA kit was compared to another commercially available hNSE assay. 28 serum samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve is:

(Commercial kit) =  $1.34 \times$  (Diametra kit) - 0.66

$r^2 = 0.971$

### 10.5. Hook Effect

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

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

*traumatic brain injury in well-appearing infants using serum and cerebrospinal markers: a possible screening tool.* Pediatrics. 2006 Feb;117(2):325-32.

- 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.
- 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
- 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.

Ed. 01/2015

DCM073-10

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Calabria 15,  
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)

## BIBLIOGRAPHY

- 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.
- 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.
- 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.
- Berger RP, Dulani T, Adelson PD, Leventhal JM, Richichi R, Kochanek PM. *Identification of inflicted*





DCM073-10  
Ed. 01/2015

## hNSE ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de hNSE en suero humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO073

### USO PREVISTO

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

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

### 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

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

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

### 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

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

La enzima presente en la fracción unida cataliza la reacción entre el sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el sustrato TMB (TMB), desarrollando una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

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

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

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

#### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores y Controles (2 frascos por Calibración y Control, liofilizados, leer cuidadosamente la sección 6.1)

CAL0	REF DCE002/7306-0
CAL1	REF DCE002/7307-0
CAL2	REF DCE002/7308-0
CAL3	REF DCE002/7309-0
CAL4	REF DCE002/7310-0
Control negativo	REF DCE045/7301-0
Control positivo	REF DCE045/7302-0

2. Tampón de incubación (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 50 mM pH 7,4, BSA 1 g/L

REF DCE001/1401-0

3. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

Anticuerpo monoclonal anti-hNSE conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) REF DCE002/7302-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo monoclonal anti-hNSE absorbido en la microplaca REF DCE002/7303-0

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L REF DCE006-0

#### 3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

#### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

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

#### Nota

Los Calibradores y los controles contienen hNSE en una matriz proteica estabilizante. Conservar todos los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y

cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit

#### 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de hNSE-incluidas en el rango CAL 0 - CAL 4. **El valor de los Calibradores es específico para cada lote.**

#### 5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado

fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.

- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

#### 6. PROCEDIMIENTO

##### 6.1. Preparación de los Calibradores y de los Controles

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

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

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

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

Los Calibradores tienen aproximadamente las siguientes concentraciones:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	4	20	50	100

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

### 6.2. Conjugado diluido.

Preparar inmediatamente antes del uso.

Añadir 20 µL de conjugado (reactivo 3) a 1 mL de tampón de incubación (reactivo 2). La cantidad que se debe preparar es proporcional al número de ensayos.

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

### 6.3. Preparación de la solución de lavado

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

Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días.

### 6.4. Preparación de la muestra

La determinación de hNSE puede realizarse en suero humano. El suero debe separarse de la sangre en un plazo de 60 minutos para evitar el aumento de hNSE debido a la liberación por parte de las células hemáticas. No usar muestras hemolizadas. Evitar el uso de plasma, puesto que las plaquetas podrían liberar cantidades significativas de hNSE.

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

### 6.5. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente (para Calibradores y Controles leer la sección 6.1).
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

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

## 7. CONTROL DE CALIDAD

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

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

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

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

### 8.3. Cálculo de los resultados

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

## 9. VALORES DE REFERENCIA

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

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

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

## 10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Especificidad

El anticuerpo reconoce específicamente la enolasa neuronal específica humana.

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

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

### 10.2. Sensibilidad

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

### 10.3. Precisión

#### 10.3.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la medición de dos

sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es  $\leq 4,4\%$ .

#### 10.3.2. Interensayo

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

### 10.4. Correlación

El kit Diametra hNSE ELISA se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 28 muestras de suero con ambos sistemas.

La curva de regresión es:

$$(\text{Kit en el mercado}) = 1,34 * (\text{kit Diametra}) - 0,66$$
$$r^2 = 0,971$$

### 10.5. Efecto gancho

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

## 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

## BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- 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.
- Berger RP, Dulani T, Adelson PD, Leventhal JM, Richichi R, Kochanek PM. *Identification of inflicted traumatic brain injury in well-appearing infants using serum and cerebrospinal markers: a possible screening tool.* Pediatrics. 2006 Feb;117(2):325-32.
- 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.
- 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.
- 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.

Ed. 01/2015

DCM073-10

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Calabria 15,  
20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. +39-02-2139184  
Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	<b>LOT</b>	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	<b>CONT</b>	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	<b>REF</b>	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

**SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING****ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

**Reazione troppo blanda (OD troppo basse)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

**Reazione troppo intensa (OD troppo alte)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**Valori inspiegabilmente fuori scala**

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**CV% intrasaggio elevato**

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

**CV% intersaggio elevato**

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

**ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS****No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

**Too low reaction (too low ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

**Too high reaction (too high ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

**Unexplainable outliers**

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

**ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS****No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

**Reacción escasa (DO demasiado bajas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

**Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**Valores inexplicablemente fuera de escala**

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**CV% intraensayo elevado**

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

**CV% interensayo elevado**

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

**ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS****Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

**Réaction trop faible (DO trop basse)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

**Réaction trop intense (DO trop élevée)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**Valeurs inexplicablement hors plage**

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**CV% intra-essai élevé**

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

**CV% inter-essai élevé**

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs