



**NSE-IRMA**

***KIP2471***



Read entire protocol before use.

## NSE-IRMA

### ***I. INTENDED USE***

Immunoradiometric assay kit for the in vitro quantitative measurement of human Neuron Specific Enolase (NSE) in serum.

### ***II. GENERAL INFORMATION***

- A. Proprietary name :** DIAsource NSE-IRMA Kit
- B. Catalog number :** KIP2471 : 96 tests
- C. Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

**For technical assistance or ordering information contact :**  
**Tel : +32 (0)67 88.99.99      Fax : +32 (0)67 88.99.96**

### ***III. CLINICAL BACKGROUND***

#### **A. Biological activities**

The glycolytic enzyme enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase, EC 4.2.1.11) exists as several dimeric isoenzymes ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$  and  $\gamma\gamma$ ). The  $\gamma\gamma$  and  $\alpha\gamma$  enolase isoenzymes are also known as neuron-specific enolase (NSE) as they are produced in central and peripheral neurons and malignant tumors of neuroectodermal origin.

Elevated serum concentrations of NSE are detected in patients with medullary carcinoma of the thyroid, pancreatic islet cell tumor, pheochromocytoma carcinoid, neuroblastoma and small-cell lung carcinoma (SCLC).

#### **B. Clinical applications**

The diagnosis of lung cancer generally requires medical imaging, endoscopy, intra-operative findings and histology.

An important indication for tumor marker determinations in lung cancer is in assessing the efficacy of therapy and post-operative follow-up care.

In patients with SCLC, serum levels of NSE reflect the response to chemotherapy.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIAsource NSE-IRMA is an immunoradiometric assay based on coated-tube separation. Mab1, the capture antibody, is attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples added to the tubes will at first show low affinity for Mab1. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with  $^{125}\text{I}$ , will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration.

#### V. REAGENTS PROVIDED

| Reagents                                                                                                                                                                                                    | 96 tests Kit     | Colour Code      | Reconstitution              |                 |                                   |                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------|
|  Tubes coated with anti NSE (monoclonal antibodies)                                                                        | 2 x 48           | orange           | <b>Ready</b> for use        |                 |                                   |                                                                  |
| <table border="1"><tr><td>Ab</td><td><sup>125</sup>I</td></tr></table><br>Anti-NSE- <sup>125</sup> I (monoclonal antibodies) in phosphate buffer with bovine serum albumin, azide (<0.1%) and inert red dye | Ab               | <sup>125</sup> I | 1 vial<br>5.5 ml<br>700 kBq | red             | <b>Ready</b> for use              |                                                                  |
| Ab                                                                                                                                                                                                          | <sup>125</sup> I |                  |                             |                 |                                   |                                                                  |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>O</td></tr></table><br>Calibrator 0 in bovin serum<br>With thymol                                                                                                     | CAL              | O                | 1 vial<br>lyophil.          | yellow          | <b>Add</b> 3ml distilled water    |                                                                  |
| CAL                                                                                                                                                                                                         | O                |                  |                             |                 |                                   |                                                                  |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table><br>Calibrators 1-5 in bovin serum with thymol (see exact value on vial labels)                                                                    | CAL              | N                | 5 vials<br>lyophil.         | yellow          | <b>Add</b> 0.5 ml distilled water |                                                                  |
| CAL                                                                                                                                                                                                         | N                |                  |                             |                 |                                   |                                                                  |
| <table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table><br>Wash solution (TRIS-HCl)                                                                                                      | WASH             | SOLN             | CONC                        | 1 vial<br>10 ml | brown                             | <b>Dilute</b> 70x with distilled water (use a magnetic stirrer). |
| WASH                                                                                                                                                                                                        | SOLN             | CONC             |                             |                 |                                   |                                                                  |
| <table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table><br>Controls 1 and 2 in human serum and thymol                                                                                                 | CONTROL          | N                | 2 vials<br>lyophil.         | silver          | <b>Add</b> 0.5 ml distilled water |                                                                  |
| CONTROL                                                                                                                                                                                                     | N                |                  |                             |                 |                                   |                                                                  |

**Note:** Use the zero calibrator for sera dilutions.

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$  and 3 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Pipette for delivery of 5 to 10 ml of distilled water
4. Vortex mixer
5. Magnetic stirrer
6. Tube shaker (400rpm)
7. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
8. Aspiration system (optional)
9. Any gamma counter capable of measuring  $^{125}\text{I}$  may be used (minimal yield 70%).

#### VII. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators** : Reconstitute the calibrator 0 with 3 ml distilled water and the calibrators 1-5 with 0.5 ml.
- B. Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

#### VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution of the calibrators and controls, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

#### IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

**NSE is also found in erythrocytes, plasma cells and platelets, it may be released into serum if separation from red cells does not occur within 60 minutes of venipuncture.**

- Serum must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 h., storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Do not use plasma samples.

#### X. PROCEDURE

##### A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use.

In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample. Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

##### B. Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample and control. For determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Briefly vortex calibrators, samples, controls and dispense 50  $\mu\text{l}$  of each into the respective tubes.
3. Dispense 50  $\mu\text{l}$  of anti-NSE- $^{125}\text{I}$  tracer into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
4. Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
5. Incubate for 2 hours at room temperature on a tube shaker (400 rpm).
6. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
7. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
8. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
9. Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
10. After the last washing, let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
11. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

#### XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. On semi logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of NSE (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is to be used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

| NSE-IRMA    |             | cpm    | B/T (%) |
|-------------|-------------|--------|---------|
| Total count |             | 275069 | 100     |
| Calibrator  | 0.0 ng/ml   | 399    | 0.15    |
|             | 2.5 ng/ml   | 2669   | 0.97    |
|             | 7.8 ng/ml   | 6710   | 2.44    |
|             | 26.0 ng/ml  | 20604  | 7.49    |
|             | 78.0 ng/ml  | 57102  | 20.76   |
|             | 270.0 ng/ml | 144748 | 52.62   |

Since no international reference material is available for NSE antigen, BSE NSE-IRMA calibrator values are assigned against a set of in-house reference standards.

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twelve zero calibrators were assayed along with a set of the other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration of the average count at zero binding plus two standard deviations, was 0.19 ng/ml.

B. Precision

| INTRA ASSAY |           |                  |        | INTER ASSAY |           |                  |        |
|-------------|-----------|------------------|--------|-------------|-----------|------------------|--------|
| Serum       | Replicate | <X> ± SD (ng/ml) | CV (%) | Serum       | Replicate | <X> ± SD (ng/ml) | CV (%) |
| A           | 20        | 12.9 ± 0.5       | 3.6    | A           | 20        | 12.7 ± 0.5       | 3.8    |
| B           | 20        | 104.4 ± 1.3      | 1.2    | B           | 20        | 101.4 ± 3.8      | 3.8    |

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

C. Accuracy

| RECOVERY TEST     |                       |              |
|-------------------|-----------------------|--------------|
| Added NSE (ng/ml) | Recovered NSE (ng/ml) | Recovery (%) |
| 20.0              | 20.0                  | 100.0        |
| 39.0              | 38.7                  | 99.0         |
| 79.0              | 76.0                  | 96.2         |
| 156.4             | 149.4                 | 95.5         |

| DILUTION TEST |          |                              |                           |
|---------------|----------|------------------------------|---------------------------|
| Sample        | Dilution | Theoretical Concent. (ng/ml) | Measured Concent. (ng/ml) |
| 1             | 1/1      |                              | 164.7                     |
|               | 1/2      | 82.4                         | 79.2                      |
|               | 1/4      | 41.2                         | 39.4                      |
|               | 1/8      | 20.6                         | 20.3                      |
|               | 1/16     | 10.3                         | 10.2                      |
|               | 1/32     | 5.1                          | 5.1                       |
|               | 1/64     | 2.6                          | 2.5                       |
|               | 1/128    | 1.3                          | 1.2                       |
| 2             | 1/1      |                              | 240.5                     |
|               | 1/2      | 120.3                        | 120.4                     |
|               | 1/4      | 60.1                         | 61.3                      |
|               | 1/8      | 30.1                         | 29.9                      |
|               | 1/16     | 15.0                         | 14.7                      |
|               | 1/32     | 7.5                          | 6.6                       |
|               | 1/64     | 3.8                          | 3.1                       |
|               | 1/128    | 1.9                          | 1.4                       |

Samples were diluted with zero calibrator .

D. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

| TIME DELAY  |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|
|             | 0'   | 10'  | 20'  | 30'  |
| S 1 (ng/ml) | 11.5 | 11.8 | 11.4 | 11.9 |
| S 2 (ng/ml) | 45.1 | 44.7 | 43.6 | 43.1 |

E. Hook-effect

Samples containing 15000 ng/ml NSE give a result higher than the last calibration point.

F. Specificity

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

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Do not freeze-thaw more than twice.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

XV. REFERENCE INTERVALS

Among 332 apparently healthy individuals, 98% of the results were below 12.5 ng/ml.

For diagnostic purposes, the results obtained from this assay should always be used in combination with the clinical examination, patient medical history and other findings.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.  
This kit contains <sup>125</sup>I (half-life: 60 days) ,emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.  
This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.  
All radioactive handling should be executed in a designated area. away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.  
Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.  
All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.  
Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.  
Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

## XVII. BIBLIOGRAPHY

1. LAMERZ R.  
**NSE (neuron-specific enolase).**  
Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Verlag Frankfurt : TH-Books, 1998; 979-981.
2. LIIPPO KK, TERHO T.  
**Concomitant monitoring of serum neuron-specific enolase and creatine kinase BB in small cell lung cancer.**  
Acta Oncol 1991; 30:321-324.
3. OLDESTAD L., PAHLMAN S., LACKGREN G., LARSSON E., GROTTÉ G., NIKSSON K.  
**Neuron specific enolase : a marker for differential diagnosis of neuroblastoma and Wilms tumor.**  
J. Pediatr Surg 1982; 17:381-385.
4. TAPIA FL., POLAK JM., BARBOSA AJ., et al.  
**Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumours.**  
Lancet 1981 ; 1 :808-811.
5. FISCHBACH W., SCHWARZ-WALLRAUCH C., JANY B.  
**Neuron-specific enolase and thymidine kinase as an aid to the diagnosis and treatment monitoring of small-cell lung cancer.**  
Cancer 1989; 63:1143-1149.
6. BONNER JA., SLOAN JA., ROWLAND KM Jr., KLEE GG., KUGLER JW., MAILLIARD JA., et al.  
**Significance of neuron-specific enolase levels before and during therapy for small-cell lung cancer.**  
Clin Cancer Res 2000; 6:597-601.
7. EBERT W., HOPPE M., MULEY T., DRINGS P.  
**Monitoring of therapy in inoperable lung cancer patients by measurement of CYFRA 21-1, TPA, CEA and NSE.**  
Anticancer RES 1997; 17:2875-2878.

## XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

|                                                  | TOTAL<br>COUNTS<br>ml                               | CALIBRATORS<br>ml           | SAMPLE(S)<br>CONTROLS<br>ml |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Calibrators (0-5)<br>Samples, Controls<br>Tracer | -<br>-<br>0.05                                      | 0.05<br>-<br>0.05           | -<br>0.05<br>0.05           |
| Incubation                                       | 2 hours at room temperature with shaking at 400 rpm |                             |                             |
| Separation<br>Working Wash<br>solution           | -<br>-                                              | Aspirate (or decant)<br>2.0 |                             |
| Separation<br>Working Wash<br>solution           | -<br>-                                              | Aspirate (or decant)<br>2.0 |                             |
| Separation                                       | -                                                   | Aspirate (or decant)        |                             |
| Counting                                         | Count tubes for 60 seconds                          |                             |                             |

|                                     |                             |                               |
|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| DIAsource Catalogue Nr :<br>KIP2471 | P.I. Number :<br>1700863/en | Revision Number :<br>090429/1 |
|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|

Revision date: 2009-04-29

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

## NSE-IRMA

### I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'énolase neurospécifique humaine (NSE) dans le sérum humain.

### II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource NSE-IRMA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP2471 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

**Pour une assistance technique ou une information sur une commande :**

**Tel : +32 (0)67 88.99.99**

**Fax : +32 (0)67 88.99.96**

### III. CONTEXTE CLINIQUE

#### A. Activités biologiques

L'enzyme glycolytique hydrolase 2-phospho-D-glycerate (EC 4.2.1.11), l'énolase, existe sous forme de plusieurs isoenzymes, des dimères ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$  et  $\gamma\gamma$ ). Les isoenzymes  $\gamma\gamma$  et  $\alpha\gamma$  de l'énolase sont également connues sous le nom d'énolase neurospécifique (NSE) parce qu'elles sont produites dans les neurones centraux et périphériques et les tumeurs malignes d'origine neuroectodermique.

Des concentrations sériques en NSE élevées sont détectées chez des patients souffrant de carcinome médullaire de la thyroïde, de tumeur pancréatique des cellules des îlots de Langerhans, de phéochromocytome carcinoïde, de neuroblastome et de carcinome pulmonaire à petites cellules (SCLC).

#### B. Application clinique

Le diagnostic de cancer du poumon nécessite généralement imagerie médicale, endoscopie, constatations opératoires et histologie extemporanée.

Une indication importante de la détermination d'un marqueur tumoral dans le cancer du poumon est l'évaluation de l'efficacité du traitement et des soins du suivi post-opératoire.

Chez les patients souffrant d'un SCLC, les taux sériques de la NSE reflètent la réponse à la chimiothérapie.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse DIASource NSE-Irma est une trousse de dosage radio-immunométrique basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Les AcM1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube plastic. Les calibrateurs ou les échantillons ajoutés dans les tubes présenteront dans un premier temps une faible affinité pour les AcM1. L'addition de l'AcM2, l'anticorps signal marqué avec l'<sup>125</sup>I, complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Suite au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l'antigène.

V. REACTIFS FOURNIS

| Réactifs                                                                                                                                                                                                                                               | Trousse de 96 analyses | Code Couleur     | Reconstitution                |                   |                                       |                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
|  Tubes recouverts avec l'anti NSE (anticorps monoclonal)                                                                                                                | 2 x 48                 | Orange           | <b>Prêt</b> à l'emploi        |                   |                                       |                                                                                |
| <table border="1"><tr><td>Ab</td><td><sup>125</sup>I</td></tr></table><br>TRACEUR: NSE marquée à l' <sup>125</sup> Iodine (grade HPLC) dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine, de l'azoture de sodium (<0,1%) et un colorant rouge inactif | Ab                     | <sup>125</sup> I | 1 flacon<br>5,5 ml<br>700 kBq | Rouge             | <b>Prêt</b> à l'emploi                |                                                                                |
| Ab                                                                                                                                                                                                                                                     | <sup>125</sup> I       |                  |                               |                   |                                       |                                                                                |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table><br>Calibrateur zéro dans du sérum bovin et du thymol                                                                                                                                         | CAL                    | 0                | 1 flacon<br>lyophilisé        | Jaune             | <b>Ajouter</b> 3,0 ml d'eau distillée |                                                                                |
| CAL                                                                                                                                                                                                                                                    | 0                      |                  |                               |                   |                                       |                                                                                |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table><br>Calibrateur N = 1 à 5 (cf. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum bovin et du thymol                                                                                            | CAL                    | N                | 5 flacons<br>lyophilisés      | Jaune             | <b>Ajouter</b> 0,5 ml d'eau distillée |                                                                                |
| CAL                                                                                                                                                                                                                                                    | N                      |                  |                               |                   |                                       |                                                                                |
| <table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table><br>Solution de Lavage (Tris-HCl)                                                                                                                                            | WASH                   | SOLN             | CONC                          | 1 flacon<br>10 ml | Brun                                  | <b>Diluer</b> 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique). |
| WASH                                                                                                                                                                                                                                                   | SOLN                   | CONC             |                               |                   |                                       |                                                                                |
| <table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table><br>Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et du thymol                                                                                                                              | CONTROL                | N                | 2 flacons<br>lyophilisés      | Gris              | <b>Ajouter</b> 0,5 ml d'eau distillée |                                                                                |
| CONTROL                                                                                                                                                                                                                                                | N                      |                  |                               |                   |                                       |                                                                                |

Note: Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- 1. Eau distillée
- 2. Pipettes pour distribuer: 50 µl, 500 µl et 3 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- 3. Pipette pour distribuer de 5 à 10 ml d'eau distillée
- 4. Agitateur vortex
- 5. Agitateur magnétique
- 6. Agitateur de tubes (400rpm)
- 7. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- 8. Système d'aspiration (optionnel)
- 9. Tout compteur gamma capable de mesurer l'<sup>125</sup>I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 3,0 ml d'eau distillée et les calibrateurs 1 à 5 avec 0,5 ml.
- B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- C. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après la reconstitution des calibrateurs et des contrôles, les aliquotes doivent être gardées à -20°C pendant 3 mois au maximum.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

La NSE se trouvant également dans les érythrocytes, les cellules plasmatiques et les plaquettes, elle peut être relâchée dans le sérum si la séparation avec les globules rouges ne se fait pas dans les 60 minutes de la ponction veineuse.

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Ne pas utiliser des échantillons de plasma.

X. MODE OPERATOIRE

- A. **Notes de manipulation**  
Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.  
Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.  
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

- B. **Mode opératoire**
  1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
  2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 50 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
  3. Distribuer 50 µl de traceur dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
  4. Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
  5. Incuber pendant 2 heures à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).
  6. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
  7. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
  8. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
  9. Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter).
  10. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
  11. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en NSE (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
3. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.



4. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

| NSE-IRMA        |             | cpm    | B/T (%) |
|-----------------|-------------|--------|---------|
| Activité totale |             | 275069 | 100     |
| Calibrateur     | 0,0 ng/ml   | 399    | 0,15    |
|                 | 2,5 ng/ml   | 2669   | 0,97    |
|                 | 7,8 ng/ml   | 6710   | 2,44    |
|                 | 26,0 ng/ml  | 20604  | 7,49    |
|                 | 78,0 ng/ml  | 57102  | 20,76   |
|                 | 270,0 ng/ml | 144748 | 52,62   |

Comme on ne dispose d'aucune référence internationale pour l'antigène NSE, les valeurs du calibrateur BSE NSE-IRMA sont attribuées à un jeu de standards de référence internes.

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,19 ng/ml.

B. Spécificité

Les anticorps monoclonaux utilisés sont spécifiques de la sous-unité g de l'énolase. On n'a pas observé de réactions croisées mesurables avec d'autres énolases.

C. Précision

| INTRA-ESSAI |    |                  |        | INTER-ESSAI |    |                  |        |
|-------------|----|------------------|--------|-------------|----|------------------|--------|
| Sérum       | N  | <X> ± SD (ng/ml) | CV (%) | Sérum       | N  | <X> ± SD (ng/ml) | CV (%) |
| A           | 20 | 12,9 ± 0,5       | 3,6    | A           | 20 | 12,7 ± 0,5       | 3,8    |
| B           | 20 | 104,4 ± 1,3      | 1,2    | B           | 20 | 101,4 ± 3,8      | 3,8    |

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

| TEST DE RECUPERATION |                       |                  |
|----------------------|-----------------------|------------------|
| NSE ajoutée (ng/ml)  | NSE récupérée (ng/ml) | Récupération (%) |
| 20,0                 | 20,0                  | 100,0            |
| 39,0                 | 38,7                  | 99,0             |
| 79,0                 | 76,0                  | 96,2             |
| 156,4                | 149,4                 | 95,5             |

| TEST DE DILUTION |          |                            |                          |
|------------------|----------|----------------------------|--------------------------|
| Echantillon      | Dilution | Concent. théorique (ng/ml) | Concent. Mesurée (ng/ml) |
| 1                | 1/1      |                            | 164,7                    |
|                  | 1/2      | 82,4                       | 79,2                     |
|                  | 1/4      | 41,2                       | 39,4                     |
|                  | 1/8      | 20,6                       | 20,3                     |
|                  | 1/16     | 10,3                       | 10,2                     |
|                  | 1/32     | 5,1                        | 5,1                      |
|                  | 1/64     | 2,6                        | 2,5                      |
|                  | 1/128    | 1,3                        | 1,2                      |
| 2                | 1/1      |                            | 240,5                    |
|                  | 1/2      | 120,3                      | 120,4                    |
|                  | 1/4      | 60,1                       | 61,3                     |
|                  | 1/8      | 30,1                       | 29,9                     |
|                  | 1/16     | 15,0                       | 14,7                     |
|                  | 1/32     | 7,5                        | 6,6                      |
|                  | 1/64     | 3,8                        | 3,1                      |
|                  | 1/128    | 1,9                        | 1,4                      |

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

| DELAÏ       |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|
|             | 0'   | 10'  | 20'  | 30'  |
| S 1 (ng/ml) | 11,5 | 11,8 | 11,4 | 11,9 |
| S 2 (ng/ml) | 45,1 | 44,7 | 43,6 | 43,1 |

F. Effet crochet

Les échantillons contenant 15000 ng/ml de NSE donnent un résultat supérieur au dernier point de calibration.

XIV. CÔNTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés en aliquotes. Ne pas congeler – décongeler plus de deux fois.
- Les critères d'acceptation de la différence entre les résultats des échantillons analysés en double doivent être basés sur les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

XV. VALEURS ATTENDUES

Parmi 332 individus apparents en bonne santé, 98% des résultats étaient en dessous de 12,5 ng/ml.

**Pour être utilisés à des fins diagnostiques, les résultats obtenus avec cet essai doivent toujours être utilisés en combinaison avec l'examen clinique, l'histoire médicale du patient et d'autres constatations.**

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.  
Cette trousse contient de l'<sup>125</sup>I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azoture de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azoture de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azoture dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

**XVII. BIBLIOGRAPHIE**

1. LAMERZ R.  
**NSE (neuron-specific enolase).**  
Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Verlag Frankfurt : TH-Books, 1998; 979-981.

2. LIIPPO KK, TERHO T.  
**Concomitant monitoring of serum neuron-specific enolase and creatine kinase BB in small cell lung cancer.**  
Acta Oncol 1991; 30:321-324.

3. OLDESTAD L., PAHLMAN S., LACKGREN G., LARSSON E., GROTTÉ G., NIKSSON K.  
**Neuron specific enolase : a marker for differential diagnosis of neuroblastoma and Wilms tumor.**  
J. Pediatr Surg 1982; 17:381-385.

4. TAPIA FL., POLAK JM., BARBOSA AJ., et al.  
**Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumours.**  
Lancet 1981 ; 1 :808-811.

5. FISCHBACH W., SCHWARZ-WALLRAUCH C., JANY B.  
**Neuron-specific enolase and thymidine kinase as an aid to the diagnosis and treatment monitoring of small-cell lung cancer.**  
Cancer 1989; 63:1143-1149.

6. BONNER JA., SLOAN JA., ROWLAND KM Jr., KLEE GG., KUGLER JW., MAILLIARD JA., et al.  
**Significance of neuron-specific enolase levels before and during therapy for small-cell lung cancer.**  
Clin Cancer Res 2000; 6:597-601.

7. EBERT W., HOPPE M., MULEY T., DRINGS P.  
**Monitoring of therapy in inoperable lung cancer patients by measurement of CYFRA 21-1, TPA, CEA and NSE.**  
Anticancer RES 1997; 17:2875-2878.

**XVIII. RESUME DU PROTOCOLE**

|                                                                                    | ACTIVITE<br>TOTALE<br>(ml)                                            | Calibrateurs<br>(ml)                                 | ECHANTIL-<br>LON(S),<br>CONTRÔLES<br>(ml) |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Calibrateurs (0-5)<br>Echantillons, Contrôles<br>Traceur                           | -<br>-<br>0,05                                                        | 0,05<br>-<br>0,05                                    | -<br>0,05<br>0,05                         |
| Incubation                                                                         | 2 heures à température ambiante sous agitation<br>continue (400 rpm). |                                                      |                                           |
| Séparation<br>Solution de Lavage<br>Séparation<br>Solution de Lavage<br>Séparation | -<br>-<br>-<br>-<br>-                                                 | Aspiration<br>2,0<br>aspiration<br>2,0<br>aspiration |                                           |
| Comptage                                                                           | Temps de comptage des tubes: 60 secondes                              |                                                      |                                           |

|                                            |                                |                                  |
|--------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Numéro de catalogue DIAsource :<br>KIP2471 | Numéro de P.I. :<br>1700863/fr | Numéro de révision :<br>090429/1 |
|--------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|

Date de révision : 2009-04-29

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

## NSE-IRMA

### I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von Neuron-spezifischer Enolase (NSE) in Serum.

### II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource NSE-IRMA Kit
- B. **Katalognummer :** KIP2471 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

**Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:**

**Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96**

**Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75**

**E-mail Ordering : [ordering@diasource.be](mailto:ordering@diasource.be)**

### III. KLINISCHER HINTERGRUND

#### A. **Biologische Aktivitäten**

Das glykolytische Enzym Enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase, EC 4.2.1.11) existiert als verschiedene Dimer-Isoenzyme ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$  und  $\gamma\gamma$ ). Die  $\gamma\gamma$  und  $\alpha\gamma$  Enolase Isoenzyme sind auch bekannt als Neuron-spezifische Enolase (NSE) wie sie in den zentralen und peripheren Neuronen und malignen Tumoren neuroektodermalen Ursprungs produziert werden.

Erhöhte Serumkonzentrationen wurden bei Patienten mit carcinoma medullare der Schilddrüse, Pankreas-Inselzelltumor, Phäochromozytom, Neuroblastom und kleinzelligem Bronchialkarzinom (SCLC) nachgewiesen.

#### B. **Klinische Anwendung**

Die Diagnose von Lungenkrebs erfordert generell medizinische, bildgebende Verfahren, Endoskopie, intraoperative Befunde und Histologie.

Eine wichtige Indikation für die Bestimmung der Tumormarker bei Lungenkrebs besteht in der Beurteilung der Effizienz der Therapie und der postoperativen Nachsorge.

Bei Patienten mit SCLC reflektieren die Serumwerte von NSE die Antwort auf die Chemotherapie.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource NSE-IRMA ist ein Radioimmuno-Assay in beschichteten Röhrchen. Mab1, die Fänger-Antikörper, haften an der unteren inneren Oberfläche des Plastikröhrchens. In die Röhrchen zugegebene Kalibratoren oder Proben zeigen zuerst eine niedrige Affinität zu Mab1. Zugabe von Mab2, des mit <sup>125</sup>I markierten Signalantikörpers, vervollständigt das System und triggert die immunologische Reaktion. Nach dem Waschen gibt die verbleibende, an den Röhrchen haftende Radioaktivität die Antigenkonzentration wieder.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

| Reagenzien                                                                                                                                                                                                                           | 96 Test Kit      | Farb Code        | Rekonstitution               |                  |                                       |                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------------------|------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|  Mit anti NSE-beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)                                                                                          | 2 x 48           | orange           | <b>gebrauchsfertig</b>       |                  |                                       |                                                                       |
| <table border="1"><tr><td>Ab</td><td><sup>125</sup>I</td></tr></table><br>TRACER: <sup>125</sup> Iodmarkierter Anti-NSE (monoklonale Antikörper) in Phosphatpuffer mit Rinderserum-albumin, Azid (<0.1%) und inertem roten Farbstoff | Ab               | <sup>125</sup> I | 1 Gefäß<br>5.5 ml<br>700 kBq | rot              | <b>gebrauchsfertig</b>                |                                                                       |
| Ab                                                                                                                                                                                                                                   | <sup>125</sup> I |                  |                              |                  |                                       |                                                                       |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table><br>Null Kalibrator in Rinderserum und Thymol                                                                                                                               | CAL              | 0                | 1 Gefäß<br>lyophilisiert     | gelb             | 3.0 ml dest. Wasser<br><b>zugeben</b> |                                                                       |
| CAL                                                                                                                                                                                                                                  | 0                |                  |                              |                  |                                       |                                                                       |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table><br>Kalibrator - N = 1 to 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Rinderserum und Thymol                                                                                    | CAL              | N                | 5 Gefäße<br>lyophilisiert    | gelb             | 0.5 ml dest. Wasser<br><b>zugeben</b> |                                                                       |
| CAL                                                                                                                                                                                                                                  | N                |                  |                              |                  |                                       |                                                                       |
| <table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table><br>Waschlösung (Tris-HCl)                                                                                                                                 | WASH             | SOLN             | CONC                         | 1 Gefäß<br>10 ml | braun                                 | 70 x mit dest. Wasser<br><b>verdünnen</b><br>(Magnetrührer benutzen). |
| WASH                                                                                                                                                                                                                                 | SOLN             | CONC             |                              |                  |                                       |                                                                       |
| <table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table><br>Kontrollen - N = 1 or 2 Humanserum und Thymol                                                                                                                       | CONTROL          | N                | 2 Gefäße<br>lyophilisiert    | silber           | 0.5 ml dest. Wasser<br><b>zugeben</b> |                                                                       |
| CONTROL                                                                                                                                                                                                                              | N                |                  |                              |                  |                                       |                                                                       |

**Bemerkung:** Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- Dest. Wasser
- Pipetten: 50 µl, 500 µl und 3 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
- Pipette zur Abgabe von 5 bis 10 ml dest. Wasser
- 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
- Absaugsystem (optional)
- Vortex Mixer
- Schüttler für Röhrchen (400rpm)
- Magnetrührer
- Jegl. Gamma-Counter, der <sup>125</sup>I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Nullstandard mit 3,0 ml dest. Wasser und die Kalibratoren 1-5 mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (70x) mit 69 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nach der Rekonstitution der Kalibratoren und Kontrollen, sollten Aliquots hergestellt und bei -20°C maximal 3 Monate aufbewahrt werden.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

**NSE findet sich ebenso in Erythrozyten, Plasmazellen und Thrombozyten; es kann wieder im Serum gelöst werden, wenn die Trennung von den roten Zellen nicht innerhalb von 60 Minuten nach der Venenpunktion stattgefunden hat.**

- Serumproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Benutzen Sie keine Plasmaproben.

X. DURCHFÜHRUNG

- A. Bemerkungen zur Durchführung**
- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

- B. Durchführung**
- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
  - Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 50 µl in ihre Röhrchen.
  - Geben Sie 50 µl des Tracers in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
  - Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
  - Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
  - Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
  - Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
  - Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
  - Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
  - Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
  - Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration NSE (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer “4 Parameter”-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

| NSE-IRMA        |             | cpm    | B/T (%) |
|-----------------|-------------|--------|---------|
| Gesamtaktivität |             | 275069 | 100     |
| Kalibrator      | 0,0 ng/ml   | 399    | 0,15    |
|                 | 2,5 ng/ml   | 2669   | 0,97    |
|                 | 7,8 ng/ml   | 6710   | 2,44    |
|                 | 26,0 ng/ml  | 20604  | 7,49    |
|                 | 78,0 ng/ml  | 57102  | 20,76   |
|                 | 270,0 ng/ml | 144748 | 52,62   |

Weil kein internationales Referenzmaterial für NSE Antigene erhältlich ist, werden BSE NSE-IRMA Kalibratorwerte gegen ein Set von in-house Referenzstandards bestimmt.

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,19 ng/ml.

B. Spezifität

Die benutzten monoklonalen Antikörper sind spezifisch für die g-Untergruppe von Enolase. Es wurden keine messbaren Kreuzreaktionen mit anderer Enolase beobachtet.

C. Präzision

| INTRA ASSAY |    |                  |        | INTER ASSAY |    |                  |        |
|-------------|----|------------------|--------|-------------|----|------------------|--------|
| Serum       | N  | <X> ± SD (ng/ml) | CV (%) | Serum       | N  | <X> ± SD (ng/ml) | CV (%) |
| A           | 20 | 12,9 ± 0,5       | 3,6    | A           | 20 | 12,7 ± 0,5       | 3,8    |
| B           | 20 | 104,4 ± 1,3      | 1,2    | B           | 20 | 101,4 ± 3,8      | 3,8    |

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

| WIEDERFINDUNGSTEST |                        |                    |
|--------------------|------------------------|--------------------|
| Zugeg. NSE (ng/ml) | Wiedergef. NSE (ng/ml) | Wiedergefunden (%) |
| 20,0               | 20,0                   | 100,0              |
| 39,0               | 38,7                   | 99,0               |
| 79,0               | 76,0                   | 96,2               |
| 156,4              | 149,4                  | 95,5               |

| VERDÜNNUNGSTEST |          |                        |                       |
|-----------------|----------|------------------------|-----------------------|
| Probe           | Verdünn. | Theoret. Konz. (ng/ml) | Gemess. Konz. (ng/ml) |
| 1               | 1/1      |                        | 164,7                 |
|                 | 1/2      | 82,4                   | 79,2                  |
|                 | 1/4      | 41,2                   | 39,4                  |
|                 | 1/8      | 20,6                   | 20,3                  |
|                 | 1/16     | 10,3                   | 10,2                  |
|                 | 1/32     | 5,1                    | 5,1                   |
|                 | 1/64     | 2,6                    | 2,5                   |
|                 | 1/128    | 1,3                    | 1,2                   |
| 2               | 1/1      |                        | 240,5                 |
|                 | 1/2      | 120,3                  | 120,4                 |
|                 | 1/4      | 60,1                   | 61,3                  |
|                 | 1/8      | 30,1                   | 29,9                  |
|                 | 1/16     | 15,0                   | 14,7                  |
|                 | 1/32     | 7,5                    | 6,6                   |
|                 | 1/64     | 3,8                    | 3,1                   |
|                 | 1/128    | 1,9                    | 1,4                   |

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

| ZEITABSTAND |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|
|             | 0'   | 10'  | 20'  | 30'  |
| S 1 (ng/ml) | 11,5 | 11,8 | 11,4 | 11,9 |
| S 2 (ng/ml) | 45,1 | 44,7 | 43,6 | 43,1 |

F. Hook-Effekt

Proben, die 15000 ng/ml NSE enthalten, ergeben ein höheres Resultat als der letzte Kalibrationspunkt.

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Erinnern Sie sich, dass zwei Gefrier-Auftau-Zyklen erlaubt sind.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. REFERENZINTERVALLE

Unter 332 anscheinend gesunden Einzelpersonen, 98% der Resultate waren unter 12,5 ng/ml.

Für diagnostische Zwecke sollten die durch diesen Assay erzielten Ergebnisse nur in Verbindung mit klinischen Untersuchungen, der Patientengeschichte und anderen Befunden genutzt werden.

XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.  
Dieser Kit enthält <sup>125</sup>I (Halbwertszeit: 60 Tagen) , das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.  
Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.  
Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen gesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.  
Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.  
Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.  
Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.  
Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

**XVII. LITERATUR**

1. LAMERZ R.  
**NSE (neuron-specific enolase).**  
Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Verlag Frankfurt : TH-Books, 1998; 979-981.

2. LIIPPO KK, TERHO T.  
**Concomitant monitoring of serum neuron-specific enolase and creatine kinase BB in small cell lung cancer.**  
Acta Oncol 1991; 30:321-324.

3. OLDESTAD L., PAHLMAN S., LACKGREN G., LARSSON E., GROTTG G., NIKSSON K.  
**Neuron specific enolase : a marker for differential diagnosis of neuroblastoma and Wilms tumor.**  
J. Pediatr Surg 1982; 17:381-385.

4. TAPIA FL., POLAK JM., BARBOSA AJ., et al.  
**Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumours.**  
Lancet 1981 ; 1 :808-811.

5. FISCHBACH W., SCHWARZ-WALLRAUCH C., JANY B.  
**Neuron-specific enolase and thymidine kinase as an aid to the diagnosis and treatment monitoring of small-cell lung cancer.**  
Cancer 1989; 63:1143-1149.

6. BONNER JA., SLOAN JA., ROWLAND KM Jr., KLEE GG., KUGLER JW., MAILLIARD JA., et al.  
**Significance of neuron-specific enolase levels before and during therapy for small-cell lung cancer.**  
Clin Cancer Res 2000; 6:597-601.

7. EBERT W., HOPPE M., MULEY T., DRINGS P.  
**Monitoring of therapy in inoperable lung cancer patients by measurement of CYFRA 21-1, TPA, CEA and NSE.**  
Anticancer RES 1997; 17:2875-2878.

**XVIII.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS**

|                                                                | GESAMT-<br>AKTIVITÄT<br>(ml)                                  | KALIBRA<br>-TOREN<br>(ml)                                                                   | PROBE(N),<br>KONTROLLEN<br>(ml) |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Kalibratoren (0-5)<br>Proben, Kontrollen<br>Tracer             | -<br>-<br>0,05                                                | 0,05<br>-<br>0,05                                                                           | -<br>0,05<br>0,05               |
| Inkubation                                                     | 2 Std. bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm) |                                                                                             |                                 |
| Trennung<br>Waschlösung<br>Trennung<br>Waschlösung<br>Trennung | -<br>-<br>-<br>-<br>-                                         | absaugen (oder dekant.)<br>2.0<br>absaugen (oder dekant.)<br>2.0<br>absaugen (oder dekant.) |                                 |
| Gamma Counter                                                  | 60 Sekunden messen                                            |                                                                                             |                                 |

|                                         |                                    |                                            |
|-----------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|
| DIAsource<br>Katalognummer :<br>KIP2471 | Beipackzettelnummer:<br>1700863/de | Nummer der<br>Originalausgabe:<br>090429/1 |
|-----------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|

Revisionsdatum : 2009-04-29

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

## NSE-IRMA

### **I. USO DEL KIT**

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro della Enolasi neurone-specifica umana (NSE, Neuron Specific Enolase) in siero.

### **II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE**

- A. Nome commerciale:** DIASource NSE-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP2471: 96 test
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

**Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:**  
Tel: +32 (0) 67 88.99.99 Fax: +32 (0) 67 88.99.96

### **III. INFORMAZIONI CLINICHE**

#### **A. Attività biologiche**

L'enzima glicolitico enolasi (2-fosfo-D-glicerato idrolasi, EC 4.2.1.11) esiste sotto forma di un certo numero di isoenzimi dimerici ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$  e  $\gamma\gamma$ ). Gli isoenzimi  $\gamma\gamma$  e  $\alpha\gamma$  enolasi sono inoltre meglio conosciuti come enolasi neurone-specifica (NSE) in quanto vengono prodotti nei neuroni centrali e periferici e nei tumori maligni di origine neuroectodermica.

Elevate concentrazioni sieriche di NSE vengono rilevate in pazienti che presentano carcinoma midollare della tiroide, tumori insulari pancreatici, feocromocitoma, carcinoide, neuroblastoma e carcinoma polmonare a cellule piccole (SCLC, Small-Cell Lung Carcinoma).

#### **B. Applicazioni cliniche**

La diagnosi di carcinoma polmonare richiede generalmente il ricorso a imaging medicale, endoscopia, riscontri intra-operatori e istologia.

Una importante indicazione per le determinazioni del marker tumorale nel carcinoma polmonare è rappresentata dalla valutazione dell'efficacia della terapia e del follow-up post-operatorio.

Nei pazienti con SCLC, i livelli sierici di NSE riflettono la risposta alla chemioterapia.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit DIASource NSE-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico con separazione coated tube. Gli anticorpi di cattura, Mabs 1, sono adsorbiti sulla superficie interna della parte inferiore di provette di polistirene. Standard e campioni hanno dapprima una bassa affinità per i Mabs 1; l’aggiunta di anticorpi di segnale Mabs 2, marcati con <sup>125</sup>I, provocano un aumento di affinità per i Mabs 1 e l’inizio della reazione immunologica. Al termine dell’incubazione la radioattività non legata alla fase solida viene allontanata mediante lavaggio. La radioattività residua è direttamente proporzionale alla concentrazione di NSE in standard e campioni.

V. REATTIVI FORNITI

| Reattivi                                                                                                                                                                                                                     | Kit da 96 test   | Codice colore    | Volume di ricostituzione       |                    |                                       |                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
|  Provette sensibilizzate con anticorpo anti NSE (anticorpi monoclonali)                                                                       | 2 x 48           | Arancione        | Pronte per l'uso               |                    |                                       |                                                                 |
| <table border="1"><tr><td>Ab</td><td><sup>125</sup>I</td></tr></table><br>Marcato: anti-NSE (Anticorpi monoclonali) marcati con <sup>125</sup> I in tampone fosfato con BSA, sodio azide (<0,1%) e un colorante inerte rosso | Ab               | <sup>125</sup> I | 1 flacone<br>5,5 ml<br>700 kBq | Rosso              | Pronto per l'uso                      |                                                                 |
| Ab                                                                                                                                                                                                                           | <sup>125</sup> I |                  |                                |                    |                                       |                                                                 |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table><br>Calibratore zero in siero bovino, contenente timolo                                                                                                             | CAL              | 0                | 1 flacone<br>liofiliz.         | Giallo             | Aggiungere 3 ml di acqua distillata   |                                                                 |
| CAL                                                                                                                                                                                                                          | 0                |                  |                                |                    |                                       |                                                                 |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table><br>Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero bovino, contenente timolo                     | CAL              | N                | 5 flaconi<br>liofiliz.         | Giallo             | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata |                                                                 |
| CAL                                                                                                                                                                                                                          | N                |                  |                                |                    |                                       |                                                                 |
| <table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table><br>Tampone di lavaggio (TRIS HCl)                                                                                                                 | WASH             | SOLN             | CONC                           | 1 flacone<br>10 ml | Bruno                                 | Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico |
| WASH                                                                                                                                                                                                                         | SOLN             | CONC             |                                |                    |                                       |                                                                 |
| <table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table><br>Controlli: N = 1 o 2, in siero umano, contenente timolo                                                                                                     | CONTROL          | N                | 2 flaconi<br>liofiliz.         | Argento            | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata |                                                                 |
| CONTROL                                                                                                                                                                                                                      | N                |                  |                                |                    |                                       |                                                                 |

Note: Usare lo calibratore zero per diluire i campioni.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

- 1. Acqua distillata.
- 2. Pipette per dispensare 50 µl, 500 µl e 3 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
- 3. Pipettare per dispensare da 5 a 10 ml di acqua distillata
- 4. Agitatore tipo vortex.
- 5. Agitatore magnetico.
- 6. Agitatore rotante (400rpm)
- 7. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
- 8. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
- 9. Contatore gamma con finestra per <sup>125</sup>I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire il calibratore zero con 3 ml di acqua distillata e i calibratori 1-5 con 0,5 ml.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione di calibratori e controlli, creare aliquote e mantenerle a -20°C per un massimo di 3 mesi.

- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull’etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell’aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

È anche possibile trovare l’NSE negli eritrociti, nelle cellule plasmatiche e nelle piastrine; l’enzima può essere rilasciato nel siero se la separazione dai globuli rossi non viene effettuata entro 60 minuti dalla venopuntura.

- Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Non utilizzare campioni di plasma.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. **Avvertenze generali**  
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell’uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.  
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.  
L’uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.  
Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

- 1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell’attività totale.
- 2. Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli. Dispensare 50 µl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
- 3. Dispensare 50 µl di marcato in tutte le provette, comprese quelle per l’attività totale.
- 4. Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d’aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
- 5. Incubare 2 ore a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm).
- 6. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l’attività totale, facendo attenzione che il puntale dell’aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
- 7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l’attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
- 8. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l’attività totale.
- 9. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l’attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
- 10. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- 11. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- 1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
- 2. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di NSE. Scartare i duplicati palesemente discordanti.
- 3. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
- 4. E’ possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.



XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di NSE in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

| NSE-IRMA        |             | cpm    | B/T (%) |
|-----------------|-------------|--------|---------|
| Attività totale |             | 275069 | 100     |
| Calibratore     | 0,0 ng/ml   | 399    | 0,15    |
|                 | 2,5 ng/ml   | 2669   | 0,97    |
|                 | 7,8 ng/ml   | 6710   | 2,44    |
|                 | 26,0 ng/ml  | 20604  | 7,49    |
|                 | 78,0 ng/ml  | 57102  | 20,76   |
|                 | 270,0 ng/ml | 144748 | 52,62   |

Dal momento che non è disponibile materiale di riferimento internazionale per l'antigene NSE, i valori del calibratore BSE NSE-IRMA sono assegnati rispetto a un set di standard di riferimento in-house.

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,19 ng/ml.

B. Specificità

Gli anticorpi monoclonali utilizzati sono specifici per la subunità g dell'enolasi. Non sono state osservate reazioni crociate misurabili con altre enolasi.

C. Precisione

| INTRA SAGGIO |    |                  |        | INTER SAGGIO |    |                  |        |
|--------------|----|------------------|--------|--------------|----|------------------|--------|
| Siero        | N  | <X> ± SD (ng/ml) | CV (%) | Siero        | N  | <X> ± SD (ng/ml) | CV (%) |
| A            | 20 | 12,9 ± 0,5       | 3,6    | A            | 20 | 12,7 ± 0,5       | 3,8    |
| B            | 20 | 104,4 ± 1,3      | 1,2    | B            | 20 | 101,4 ± 3,8      | 3,8    |

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

| TEST DI DILUIZIONE |            |                                |                                 |
|--------------------|------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Campione           | Diluizione | Concentrazione teorica (ng/ml) | Concentrazione misurata (ng/ml) |
| 1                  | 1/1        |                                | 164,7                           |
|                    | 1/2        | 82,4                           | 79,2                            |
|                    | 1/4        | 41,2                           | 39,4                            |
|                    | 1/8        | 20,6                           | 20,3                            |
|                    | 1/16       | 10,3                           | 10,2                            |
|                    | 1/32       | 5,1                            | 5,1                             |
|                    | 1/64       | 2,6                            | 2,5                             |
|                    | 1/128      | 1,3                            | 1,2                             |
| 2                  | 1/1        |                                | 240,5                           |
|                    | 1/2        | 120,3                          | 120,4                           |
|                    | 1/4        | 60,1                           | 61,3                            |
|                    | 1/8        | 30,1                           | 29,9                            |
|                    | 1/16       | 15,0                           | 14,7                            |
|                    | 1/32       | 7,5                            | 6,6                             |
|                    | 1/64       | 3,8                            | 3,1                             |
|                    | 1/128      | 1,9                            | 1,4                             |

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

| TEST DI RECUPERO     |                        |              |
|----------------------|------------------------|--------------|
| NSE aggiunta (ng/ml) | NSE recuperata (ng/ml) | Recupero (%) |
| 20,0                 | 20,0                   | 100,0        |
| 39,0                 | 38,7                   | 99,0         |
| 79,0                 | 76,0                   | 96,2         |
| 156,4                | 149,4                  | 95,5         |

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione  
Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

| TEMPO TRASCORSO |      |      |      |      |
|-----------------|------|------|------|------|
|                 | 0'   | 10'  | 20'  | 30'  |
| S 1 (ng/ml)     | 11,5 | 11,8 | 11,4 | 11,9 |
| S 2 (ng/ml)     | 45,1 | 44,7 | 43,6 | 43,1 |

E. Effetto hook  
I campioni contenenti 15000 ng/ml NSE danno un risultato maggiore rispetto all'ultimo punto di calibrazione.

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un'aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Fra 332 individui apparentemente in buona salute, 98% dei risultati erano inferiore a 12,5 ng/ml.  
Per fini diagnostici, i risultati di questo dosaggio devono essere sempre utilizzati come complemento ad esami clinici, dati anamnestici e altro.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza  
Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.  
Il kit contiene <sup>125</sup>I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.  
L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.  
Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.  
In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.  
Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.  
Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1.

LAMERZ R.  
NSE (neuron-specific enolase).  
Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Verlag Frankfurt : TH-Books, 1998; 979-981.

2.

LIIPPO KK, TERHO T.  
Concomitant monitoring of serum neuron-specific enolase and creatine kinase BB in small cell lung cancer.  
Acta Oncol 1991; 30:321-324.

3. OLDESTAD L., PAHLMAN S., LACKGREN G., LARSSON E., GROTTÉ G., NIKSSON K.  
**Neuron specific enolase : a marker for differential diagnosis of neuroblastoma and Wilms tumor.**  
J. Pediatr Surg 1982; 17:381-385.
  
4. TAPIA FL., POLAK JM., BARBOSA AJ., et al.  
**Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumours.**  
Lancet 1981 ; 1 :808-811.
  
5. FISCHBACH W., SCHWARZ-WALLRAUCH C., JANY B.  
**Neuron-specific enolase and thymidine kinase as an aid to the diagnosis and treatment monitoring of small-cell lung cancer.**  
Cancer 1989; 63:1143-1149.
  
6. BONNER JA., SLOAN JA., ROWLAND KM Jr., KLEE GG., KUGLER JW., MAILLIARD JA., et al.  
**Significance of neuron-specific enolase levels before and during therapy for small-cell lung cancer.**  
Clin Cancer Res 2000; 6:597-601.
  
7. EBERT W., HOPPE M., MULEY T., DRINGS P.  
**Monitoring of therapy in inoperable lung cancer patients by measurement of CYFRA 21-1, TPA, CEA and NSE.**  
Anticancer RES 1997; 17:2875-2878.

### ***XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO***

|                                                                                                                                       | Attività totale<br><br>ml                            | Calibratore<br><br>ml                                    | Campioni<br>Controlli<br>ml |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Calibratore (0 - 5)<br>Campioni, controlli<br>Marcato                                                                                 | -<br>-<br>50                                         | 50<br>-<br>50                                            | -<br>50<br>50               |
| Incubazione                                                                                                                           | 2 ore a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm) |                                                          |                             |
| Separazione<br>Soluzione di lavoro<br>tampone di lavaggio<br>Separazione<br>Soluzione di lavoro<br>tampone di lavaggio<br>Separazione |                                                      | Aspirare<br>2 ml<br><br>Aspirare<br>2 ml<br><br>Aspirare |                             |
| Conteggio                                                                                                                             | Contare le provette per 1 minuto                     |                                                          |                             |

|                                              |                             |                                |
|----------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Numero di catalogo di DIAsource :<br>KIP2471 | P.I. numero :<br>1700863/it | Revisione numero :<br>090429/1 |
|----------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|

Data di revisione : 2009-04-29

Leer el protocolo completo antes de usar.

## NSE-IRMA

### I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de enolasa específica neuronal (NSE) humana en suero.

### II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIASource NSE-IRMA Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP2471 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:  
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

### III. INFORMACIÓN CLÍNICA

#### A. Actividades Biológicas

La enzima glicolítica enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa, EC 4.2.1.11) existe como varias isoenzimas diméricas ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$  y  $\gamma\gamma$ ). Las isoenzimas enolasa  $\gamma\gamma$  y  $\alpha\gamma$  también se conocen como enolasa específica neuronal (NSE) ya que se producen en neuronas centrales y periféricas, así como en tumores malignos de origen neuroectodérmico.

Se detectan elevadas concentraciones de NSE en suero en pacientes con carcinoma medular de tiroides, tumor de células de islotes pancreáticos, feocromocitoma carcinoide, neuroblastoma y carcinoma de pulmón de célula pequeña o microcítico (SCLC).

#### B. Aplicación clínica

El diagnóstico del cáncer de pulmón normalmente requiere generación de imágenes de uso médico, endoscopia, resultados intraoperatorios e histología.

Una indicación importante de las determinaciones por marcadores tumorales en el cáncer de pulmón se encuentra en la evaluación de la eficacia de la terapia y la atención del seguimiento postoperatorio.

En pacientes con SCLC, los niveles de NSE en suero reflejan la respuesta a la quimioterapia.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

NSE-Irma de DIASource es un radioinmunoensayo basado en la separación en tubo recubierto de anticuerpos. Mabs1, los anticuerpos de captura, se adhieren en la parte interior inferior de las paredes del tubo de poliestireno. Al principio calibradores o muestras añadidos en los tubos presentarán poca afinidad con Mabs1. La adición de Mab2, el anticuerpo señal marcado con <sup>125</sup>I, completará el sistema y activará la reacción inmunológica. Después del lavado, la radiactividad restante adherida al tubo, refleja la concentración del antígeno.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

| Reactivos                                                                                                                                                                                                                            | 96 test Kit      | Código de Color  | Reconstitución              |                 |                                 |                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|  Tubos recubiertos con anti NSE (anticuerpos monoclonales)                                                                                            | 2 x 48           | naranja          | Listo para uso              |                 |                                 |                                                              |
| <table border="1"><tr><td>Ab</td><td><sup>125</sup>I</td></tr></table><br>TRAZADOR: anti-NSE (anticuerpos monoclonales) marcado con I <sup>125</sup> en tampón fosfato con albúmina bovina, azida (<0,1%) y un colorante rojo inerte | Ab               | <sup>125</sup> I | 1 vial<br>5,5 ml<br>700 kBq | rojo            | Listo para uso                  |                                                              |
| Ab                                                                                                                                                                                                                                   | <sup>125</sup> I |                  |                             |                 |                                 |                                                              |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table><br>Calibrador cero en suero bovino y thymol                                                                                                                                | CAL              | 0                | 1 vial<br>liofilizado       | amarillo        | Añadir 3 ml de agua destilada   |                                                              |
| CAL                                                                                                                                                                                                                                  | 0                |                  |                             |                 |                                 |                                                              |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table><br>Calibradores N = 1 a 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero bovino y thymol                                                                            | CAL              | N                | 5 viales<br>liofilizados    | amarillo        | Añadir 0,5 ml de agua destilada |                                                              |
| CAL                                                                                                                                                                                                                                  | N                |                  |                             |                 |                                 |                                                              |
| <table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table><br>Solución de lavado (Tris-HCl)                                                                                                                          | WASH             | SOLN             | CONC                        | 1 vial<br>10 ml | marrón                          | Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético) |
| WASH                                                                                                                                                                                                                                 | SOLN             | CONC             |                             |                 |                                 |                                                              |
| <table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table><br>Controles - N = 1 o 2 en suero humano y thymol                                                                                                                      | CONTROL          | N                | 2 viales<br>liofilizados    | plateado        | Añadir 0,5 ml de agua destilada |                                                              |
| CONTROL                                                                                                                                                                                                                              | N                |                  |                             |                 |                                 |                                                              |

Nota: Para diluciones de muestras utilizar calibrador cero.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50µl, 500µl y 3 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Pipeta para suministrar de 5 a 10 ml de agua destilada
4. Vortex
5. Agitador magnético
6. Agitador de tubos (400rpm)
7. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
8. Sistema de aspiración (opcional)
9. Contador de radiaciones gamma para medir I<sup>125</sup> (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. **Calibradores:**Reconstituir el calibrador cero con 3,0 ml de agua destilada y los calibradores 1-5 con 0,5 ml.
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.

- Después de reconstituir los calibradores y controles, deben hacerse partes alícuotas y mantenerse a –20° C durante un máximo de 3 meses.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

También se encuentra NSE en eritrocitos, células plasmáticas y plaquetas. Puede liberarse en el suero si no se produce la separación de los glóbulos rojos a los 60 minutos de la punción de vena.

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a –20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- No utilizar muestras de plasma.

X. PROTOCOLO

- A. **Notas de manejo**  
No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.  
Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.  
El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.  
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

- B. **Protocolo**
1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
  2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 50 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
  3. Dispensar 50 µL del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.
  4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja adherida a las paredes de los tubos.
  5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
  6. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
  7. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
  8. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
  9. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
  10. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
  11. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Representar en un gráfico semilogarítmico o linear las c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de NSE (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los extremos claros.
3. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

| NSE-IRMA        |             | cpm    | B/T (%) |
|-----------------|-------------|--------|---------|
| Cuentas Totales |             | 275069 | 100     |
| Calibrador      | 0,0 ng/ml   | 399    | 0,15    |
|                 | 2,5 ng/ml   | 2669   | 0,97    |
|                 | 7,8 ng/ml   | 6710   | 2,44    |
|                 | 26,0 ng/ml  | 20604  | 7,49    |
|                 | 78,0 ng/ml  | 57102  | 20,76   |
|                 | 270,0 ng/ml | 144748 | 52,62   |

Ya que no hay material de referencia internacional disponible para el antígeno NSE, los valores del calibrador BSE NSE-IRMA se asignan respecto a un conjunto de estándares de referencia internos.

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

Él limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,19 ng/ml.

B. Especificidad

Los anticuerpos monoclonales utilizados son específicos para la subunidad g de la enolasa. No se han observado reacciones cruzadas cuantificables con otra enolasa.

C. Precisión

| PRECISIÓN INTRA-ENSAYO |    |                  |        | PRECISIÓN INTER-ENSAYO |    |                  |        |
|------------------------|----|------------------|--------|------------------------|----|------------------|--------|
| Suero                  | N  | <X> ± SD (ng/ml) | CV (%) | Suero                  | N  | <X> ± SD (ng/ml) | CV (%) |
| A                      | 20 | 12,9 ± 0,5       | 3,6    | A                      | 20 | 12,7 ± 0,5       | 3,8    |
| B                      | 20 | 104,4 ± 1,3      | 1,2    | B                      | 20 | 101,4 ± 3,8      | 3,8    |

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

| TEST DILUCIÓN |          |                          |                         |
|---------------|----------|--------------------------|-------------------------|
| Muestra       | Dilución | Concent. Teórica (ng/ml) | Concent. Medida (ng/ml) |
| 1             | 1/1      |                          | 164,7                   |
|               | 1/2      |                          | 79,2                    |
|               | 1/4      | 82,4                     | 39,4                    |
|               | 1/8      | 41,2                     | 20,3                    |
|               | 1/16     | 20,6                     | 10,2                    |
|               | 1/32     | 10,3                     | 5,1                     |
|               | 1/64     | 5,1                      | 2,5                     |
|               | 1/128    | 2,6                      | 1,2                     |
|               |          | 1,3                      |                         |
|               | 1/1      |                          | 240,5                   |
| 2             | 1/2      |                          | 120,4                   |
|               | 1/4      | 120,3                    | 61,3                    |
|               | 1/8      | 60,1                     | 29,9                    |
|               | 1/16     | 30,1                     | 14,7                    |
|               | 1/32     | 15,0                     | 6,6                     |
|               | 1/64     | 7,5                      | 3,1                     |
|               | 1/128    | 3,8                      | 1,4                     |
|               |          | 1,9                      |                         |
|               |          |                          |                         |
|               |          |                          |                         |

Las muestras fueron diluidas con el calibrador cero.

| TEST DE RECUPERACIÓN |                        |                |
|----------------------|------------------------|----------------|
| NSE añadido (ng/ml)  | NSE Recuperado (ng/ml) | Recuperado (%) |
| 20,0                 | 20,0                   | 100,0          |
| 39,0                 | 38,7                   | 99,0           |
| 79,0                 | 76,0                   | 96,2           |
| 156,4                | 149,4                  | 95,5           |

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos recubiertos.

| TIEMPO DE ESPERA |      |      |      |      |
|------------------|------|------|------|------|
|                  | 0'   | 10'  | 20'  | 30'  |
| S 1 (ng/ml)      | 11,5 | 11,8 | 11,4 | 11,9 |
| S 2 (ng/ml)      | 45,1 | 44,7 | 43,6 | 43,1 |

F. Efecto “hook”

Las muestras que contienen 15.000 ng/ml de NSE proporcionan un resultado superior al del último punto de calibración.

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/ó Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Entre 332 individuos al parecer sanos, los 98% de los resultados estaban debajo de 12,5 ng/ml.

Con fines de diagnóstico, los resultados obtenidos en este ensayo siempre deben utilizarse en combinación con el examen clínico, el historial médico del paciente y otros resultados.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I<sup>125</sup> (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/ó la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. LAMERZ R.  
**NSE (neuron-specific enolase).**  
Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Verlag Frankfurt : TH-Books, 1998; 979-981.

2. LIIPPO KK, TERHO T.  
**Concomitant monitoring of serum neuron-specific enolase and creatine kinase BB in small cell lung cancer.**  
Acta Oncol 1991; 30:321-324.

3. OLDESTAD L., PAHLMAN S., LACKGREN G., LARSSON E., GROTTG G., NIKSSON K.  
**Neuron specific enolase : a marker for differential diagnosis of neuroblastoma and Wilms tumor.**  
J. Pediatr Surg 1982; 17:381-385.

4. TAPIA FL., POLAK JM., BARBOSA AJ., et al.  
**Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumours.**  
Lancet 1981 ; 1 :808-811.

5. FISCHBACH W., SCHWARZ-WALLRAUCH C., JANY B.  
**Neuron-specific enolase and thymidine kinase as an aid to the diagnosis and treatment monitoring of small-cell lung cancer.**  
Cancer 1989; 63:1143-1149.

6. BONNER JA., SLOAN JA., ROWLAND KM Jr., KLEE GG., KUGLER JW., MAILLIARD JA., et al.  
**Significance of neuron-specific enolase levels before and during therapy for small-cell lung cancer.**  
Clin Cancer Res 2000; 6:597-601.

7. EBERT W., HOPPE M., MULEY T., DRINGS P.  
**Monitoring of therapy in inoperable lung cancer patients by measurement of CYFRA 21-1, TPA, CEA and NSE.**  
Anticancer RES 1997; 17:2875-2878.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

|                       | CUENTAS<br>TOTALES<br>(µl)                     | CALIBRADO<br>RES<br>(µl) | MUESTRA(S)<br>CONTROL(S)<br>(µl) |
|-----------------------|------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Calibradores (0 al 5) | -                                              | 50                       | -                                |
| Muestras, controles   | -                                              | -                        | 50                               |
| Trazador              | 50                                             | 50                       | 50                               |
| Incubación            | 2 horas a T.A en agitación constante (400 rpm) |                          |                                  |
| Separación            | -                                              | aspirar                  |                                  |
| Solución de Lavado    | -                                              | 2,0 ml                   |                                  |
| Separación            | -                                              | aspirar                  |                                  |
| Solución de Lavado    | -                                              | 2,0 ml                   |                                  |
| Separación            | -                                              | aspirar                  |                                  |
| Contaje               | Contar los tubos durante 60 segundos           |                          |                                  |

|                                    |                             |                           |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| DIAsource Catalogo Nr :<br>KIP2471 | P.I. Numero :<br>1700863/es | Revisión nr :<br>090429/1 |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|

Fecha de la revisión : 2009-04-29

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

## NSE-IRMA

### ***I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ***

Κιτ ανοσοραδιομετρικής εξέτασης για τον in vitro ποσοτικό προσδιορισμό της ανθρώπινης Ειδικής Νευρωνικής Ενολάσης (NSE) στον ορό.

### ***II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ***

- A. Εμπορική ονομασία:** Κιτ NSE-IRMA της DIASource
- B. Αριθμός καταλόγου:** KIP2471: 96 εξετάσεις
- Γ. Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:  
Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99 Fax: +32 (0)67 88.99.96

### ***III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ***

#### ***A Βιολογικές δράσεις***

Το γλυκολυτικό ένζυμο ενολάση (2-φωσφο- D-γλυκερινική υδρολάση, EC 4.2.1.11) υφίσταται με τη μορφή διμερών ισοενζύμων (αα, αβ, αγ, ββ and γγ). Τα ισοένζυμα ενολάσης γγ και αγ είναι επίσης γνωστά ως Ειδική Νευρωνική Ενολάση (NSE) δεδομένου του ότι παράγονται σε νευρώνες του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος όπως επίσης και σε κακοήθεις όγκους νευροεκτοδερμικής προέλευσης.

Υψηλά επίπεδα NSE στον ορό, διαπιστώνονται σε ασθενείς με μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς, όγκο των νησιδίων του Langerhans στο πάγκρεας, καρκινοειδές φαιοχρωμοκύτωμα, νευροβλάστωμα και μικροκυτταρικό καρκίνωμα των πνευμόνων (SCLC).

#### ***B. Κλινική εφαρμογή***

Η διάγνωση του καρκίνου των πνευμόνων συνήθως απαιτεί ακτινολογικές εξετάσεις, ενδοσκοπική, ενδοεγχειρητικά ευρήματα και ιστολογική ανάλυση.

Μια σημαντική ένδειξη για προσδιορισμούς καρκινικών δεικτών στον καρκίνο του πνεύμονα βρίσκεται στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και της μετεγχειρητικής παρακολούθησης.

Σε ασθενείς με SCLC, τα επίπεδα NSE στο ορό αντικατοπτρίζουν την απόκριση στη χημειοθεραπεία.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση NSE-Irma της DIASource είναι ένας ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός που βασίζεται σε διαχωρισμό επιστρωμένων σωληναρίων. Τα Mabs1, τα αντισώματα σύλληψης, προσκολλώνται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια του πλαστικού σωληναρίου. Οι βαθμονομητές ή τα δείγματα που προστίθενται στα σωληνάρια εμφανίζουν κατ' αρχήν χαμηλή συγγένεια προς τα Mabs1. Προσθήκη Mab2, του αντισώματος σηματοδότησης που είναι σημασμένο με <sup>125</sup>I, θα ολοκληρώσει το σύστημα και θα πυροδοτήσει την ανοσολογική αντίδραση. Μετά την πλύση, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια, που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο, αντανακλά τη συγκέντρωση του αντιγόνου.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

| Αντιδραστήρια                                                                                                                                                                                                                                                       | Κιτ 96<br>εξετάσεων               | Χρωματικό<br>ς<br>κωδικός | Ανασύσταση                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <div><div></div><div>Σωληνάρια επιστρωμένα με anti NSE (μονοκλωνικά αντισώματα)</div></div>                                                                                                                                                                         | 2 x 48                            | πορτοκαλί                 | Έτοιμο για χρήση                                                                     |
| <div><div><div>Ab</div><div><sup>125</sup>I</div></div><div>ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: Αντι-NSE (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με <sup>125</sup>Ιωδίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόειο ορολευκωματίνη, αζίδιο (&lt;0,1%) και μια αδρανής κόκκινη χρωστική</div></div> | 1 φιαλίδιο<br>5,5 ml<br>700 kBq   | κόκκινο                   | Έτοιμο για χρήση                                                                     |
| <div><div><div>CAL</div><div>0</div></div><div>Μηδενικός βαθμονομητής σε βόειο ορό με θυμόλη</div></div>                                                                                                                                                            | 1 φιαλίδιο<br>λυοφιλοποιημ<br>ένο | κίτρινο                   | Προσθέστε 3,0 ml<br>απεσταγμένου νερού                                               |
| <div><div><div>CAL</div><div>N</div></div><div>Βαθμονομητής N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε βόειο ορό και θυμόλη</div></div>                                                                                             | 5 φιαλίδια<br>λυοφιλοποιημ<br>ένο | κίτρινο                   | Προσθέστε 0,5 ml<br>απεσταγμένου νερού                                               |
| <div><div><div>WASH</div><div>SOLN</div><div>CONC</div></div><div>Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)</div></div>                                                                                                                                                             | 1 φιαλίδιο<br>10 ml               | καφέ                      | Αραιώστε 70 x με<br>απεσταγμένο νερό<br>(χρησιμοποιήστε<br>μαγνητικό<br>αναδευτήρα). |
| <div><div><div>CONTROL</div><div>N</div></div><div>Υλικά ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη</div></div>                                                                                                                                                 | 2 φιαλίδια<br>λυοφιλοποιημ<br>ένο | ασhimί                    | Προσθέστε 0,5 ml<br>απεσταγμένου νερού                                               |

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 50 µl, 500 µl και 3 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Πιπέτες για διανομή από 5 έως 10 ml απεσταγμένου νερού
4. Αναμεικτής στροβιλισμού
5. Μαγνητικός αναδευτήρας
6. Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (400rpm)
7. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
8. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
9. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε αριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του <sup>125</sup>I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές: Πραγματοποιήστε την ανασύσταση του μηδενικού βαθμονομητή με 3 ml απεσταγμένου νερού και των βαθμονομητών 1-5 με 0,5 ml.

- B. Υλικά ελέγχου: Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- G. Διάλυμα πλύσης εργασίας: Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Έπειτα από την ανασύσταση των βαθμονομητών και των ορών ελέγχου, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάσματα και να διατηρηθούν στους –20°C για ένα μέγιστο χρονικό διάστημα 3 μηνών.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

NSE βρίσκεται επίσης σε ερυθροκύτταρα, πλασματοκύτταρα και αιμοπετάλια. Μπορεί να ελευθερωθεί στον ορό εάν ο διαχωρισμός από τα ερυθροκύτταρα δεν πραγματοποιηθεί εντός 60 λεπτών από τη διάτρηση της φλέβας.

- Ο ορός πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Μη χρησιμοποιείτε δείγματα πλάσματος.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό  
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείζτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

- B. Διαδικασία
1. Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
2. Στροβιλίστε για λίγο βαθμονομητές, δείγματα και υλικά ελέγχου και διανείμετε 50 µl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Διανείμετε 50 µl ιχνηθέτη σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη <sup>125</sup>I ("total").
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
5. Επώαστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).



9. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
10. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
11. Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απαριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

**XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
2. Σε ημίλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της NSE (τετημημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
3. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε υλικό ελέγχου και δείγμα με παρεμβολή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
4. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

**XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως επεξήγηση και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

| NSE-IRMA         |             | cpm    | B/T (%) |
|------------------|-------------|--------|---------|
| Συνολική μέτρηση |             | 275069 | 100     |
| Βαθμονομητής     | 0,0 ng/ml   | 399    | 0,15    |
|                  | 2,5 ng/ml   | 2669   | 0,97    |
|                  | 7,8 ng/ml   | 6710   | 2,44    |
|                  | 26,0 ng/ml  | 20604  | 7,49    |
|                  | 78,0 ng/ml  | 57102  | 20,76   |
|                  | 270,0 ng/ml | 144748 | 52,62   |

Δεδομένου του ότι δεν υπάρχει διαθέσιμο υλικό διεθνούς αναφοράς για το αντιγόνο NSE, οι τιμές των βαθμονομητών BSE NSE-IRMA προσδιορίζονται έναντι ενός εσωτερικού σετ προτύπων αναφοράς.

**XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ**

**A. Όριο ανίχνευσης**

Υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,19 ng/ml.

**B. Ειδικότητα**

Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται είναι ειδικά για την υπομονάδα g της ενολάσης. Δεν έχουν παρατηρηθεί διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλες ενολάσες.

**Γ. Ακρίβεια**

| ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ |    |                       |             | ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ |    |                       |             |
|---------------------------|----|-----------------------|-------------|-----------------------------------|----|-----------------------|-------------|
| Ορός                      | N  | <X> ± T.A.<br>(ng/ml) | Σ.Δ.<br>(%) | Ορός                              | N  | <X> ± T.A.<br>(ng/ml) | Σ.Δ.<br>(%) |
| A                         | 20 | 12,9 ± 0,5            | 3,6         | A                                 | 20 | 12,7 ± 0,5            | 3,8         |
| B                         | 20 | 104,4 ± 1,3           | 1,2         | B                                 | 20 | 101,4 ± 3,8           | 3,8         |

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

**Δ. Ορθότητα**

| ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ          |                            |                 |
|----------------------------|----------------------------|-----------------|
| Προστεθείσα NSE<br>(ng/ml) | Ανακτηθείσα NSE<br>(ng/ml) | Ανάκτηση<br>(%) |
| 20,0                       | 20,0                       | 100,0           |
| 39,0                       | 38,7                       | 99,0            |
| 79,0                       | 76,0                       | 96,2            |
| 156,4                      | 149,4                      | 95,5            |

| ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ |         |                                     |                                      |
|------------------|---------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Δείγμα           | Αραίωση | Θεωρητική<br>συγκέντρωση<br>(ng/ml) | Μετρηθείσα<br>συγκέντρωση<br>(ng/ml) |
| 1                | 1/1     |                                     | 164,7                                |
|                  | 1/2     |                                     | 79,2                                 |
|                  | 1/4     | 82,4                                | 39,4                                 |
|                  | 1/8     | 41,2                                | 20,3                                 |
|                  | 1/16    | 20,6                                | 10,2                                 |
|                  | 1/32    | 10,3                                | 5,1                                  |
|                  | 1/64    | 5,1                                 | 2,5                                  |
|                  | 1/128   | 2,6                                 | 1,2                                  |
| 2                |         | 1,3                                 |                                      |
|                  | 1/1     |                                     | 240,5                                |
|                  | 1/2     |                                     | 120,4                                |
|                  | 1/4     | 120,3                               | 61,3                                 |
|                  | 1/8     | 60,1                                | 29,9                                 |
|                  | 1/16    | 30,1                                | 14,7                                 |
|                  | 1/32    | 15,0                                | 6,6                                  |
|                  | 1/64    | 7,5                                 | 3,1                                  |
|                  |         | 3,8                                 |                                      |
|                  | 1/128   | 1,9                                 | 1,4                                  |

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

**E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος**

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ορθά ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

| ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ |      |      |      |      |
|--------------|------|------|------|------|
|              | 0'   | 10'  | 20'  | 30'  |
| S 1 (ng/ml)  | 11,5 | 11,8 | 11,4 | 11,9 |
| S 2 (ng/ml)  | 45,1 | 44,7 | 43,6 | 43,1 |

**ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)**

Δείγματα που περιέχουν 15000 ng/ml NSE δίνουν ένα αποτέλεσμα υψηλότερο από το τελευταίο σημείο βαθμονόμησης.

**XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ**

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για το υλικό ελέγχου 1 ή/και το υλικό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου, τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα. Μην καταψύχετε-αποψύχετε περισσότερο από δύο φορές.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Μεταξύ 332 φανερά υγιών ατόμων, 98% των αποτελεσμάτων ήταν κάτω των 12,5 ng/ml.  
Για διαγνωστικούς σκοπούς, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από αυτόν τον προσδιορισμό θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντα σε συνδυασμό με την κλινική εξέταση, το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς και άλλα ευρήματα.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

**Ασφάλεια**  
Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.  
Το kit αυτό περιέχει το <sup>125</sup>I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.  
Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσότοπων. Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.  
Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.  
Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίζει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσωρεύσης αζιδίου.  
Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και αναλόςιμα γάντια.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. LAMERZ R.  
**NSE (neuron-specific enolase).**  
Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Verlag Frankfurt : TH-Books, 1998; 979-981.

2. LIIPPO KK, TERHO T.  
**Concomitant monitoring of serum neuron-specific enolase and creatine kinase BB in small cell lung cancer.**  
Acta Oncol 1991; 30:321-324.

3. OLDESTAD L., PAHLMAN S., LACKGREN G., LARSSON E., GROTTÉ G., NIKSSON K.  
**Neuron specific enolase : a marker for differential diagnosis of neuroblastoma and Wilms tumor.**  
J. Pediatr Surg 1982; 17:381-385.

4. TAPIA FL., POLAK JM., BARBOSA AJ., et al.  
**Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumours.**  
Lancet 1981 ; 1 :808-811.

5. FISCHBACH W., SCHWARZ-WALLRAUCH C., JANY B.  
**Neuron-specific enolase and thymidine kinase as an aid to the diagnosis and treatment monitoring of small-cell lung cancer.**  
Cancer 1989; 63:1143-1149.

6. BONNER JA., SLOAN JA., ROWLAND KM Jr., KLEE GG., KUGLER JW., MAILLIARD JA., et al.  
**Significance of neuron-specific enolase levels before and during therapy for small-cell lung cancer.**  
Clin Cancer Res 2000; 6:597-601.

7. EBERT W., HOPPE M., MULEY T., DRINGS P.  
**Monitoring of therapy in inoperable lung cancer patients by measurement of CYFRA 21-1, TPA, CEA and NSE.**  
Anticancer RES 1997; 17:2875-2878.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

|                                                                                                       | ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ<br>ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ<br>(ml)                          | ΒΑΘΜΟΝΟ<br>ΜΗΤΕΣ<br>(ml)                                                                       | ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ)<br>ΥΛΙΚΑ<br>ΕΛΕΓΧΟΥ<br>(ml) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Βαθμονομητές (0-5)<br>Δείγματα, Υλικά<br>ελέγχου<br>Ιχνηθέτης                                         | -<br>-<br>0,05                                          | 0,05<br>-<br>0,05                                                                              | -<br>0,05<br>0,05                      |
| Επώαση                                                                                                | 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 400 rpm |                                                                                                |                                        |
| Διαχωρισμός<br>Διάλυμα πλύσης<br>εργασίας<br>Διαχωρισμός<br>Διάλυμα πλύσης<br>εργασίας<br>Διαχωρισμός | -<br>-<br>-<br>-<br>-                                   | Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)<br>2,0<br>Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)<br>2,0<br>Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) |                                        |
| Μέτρηση                                                                                               | Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα                  |                                                                                                |                                        |

|                                     |                             |                              |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Αρ. καταλόγου DIASource:<br>KIP2471 | Αριθμός P.I.:<br>1700863/el | Αρ. αναθεώρησης:<br>090429/1 |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|

ημερομηνία αναθεώρησης : 2009-04-29

|  | <u>Used symbols</u>                | <u>Symboles utilisés</u>                  |
|--|------------------------------------|-------------------------------------------|
|  | Consult instructions for use       | Consulter les instructions d'utilisation  |
|  | Storage temperature                | Température de conservation               |
|  | Use by                             | Utiliser jusque                           |
|  | Batch code                         | Numéro de lot                             |
|  | Catalogue number                   | Référence de catalogue                    |
|  | Control                            | Contrôle                                  |
|  | In vitro diagnostic medical device | Dispositif médical de diagnostic in vitro |
|  | Manufacturer                       | Fabricant                                 |
|  | Contains sufficient for <n> tests  | Contenu suffisant pour <n> tests          |
|  | Wash solution concentrated         | Solution de lavage concentrée             |
|  | Zero calibrator                    | Calibrateur zéro                          |
|  | Calibrator #                       | Calibrateur #                             |
|  | Control #                          | Contrôle #                                |
|  | Tracer                             | Traceur                                   |
|  | Tracer                             | Traceur                                   |
|  | Tracer concentrated                | Traceur concentré                         |
|  | Tracer concentrated                | Traceur concentré                         |
|  | Tubes                              | Tubes                                     |
|  | Incubation buffer                  | Tampon d'incubation                       |
|  | Acetonitrile                       | Acétonitrile                              |
|  | Serum                              | Sérum                                     |
|  | Specimen diluent                   | Diluant du spécimen                       |
|  | Dilution buffer                    | Tampon de dilution                        |
|  | Antiserum                          | Antisérum                                 |
|  | Immunoabsorbent                    | Immunoabsorbant                           |
|  | Calibrator diluent                 | Diluant de calibrateur                    |
|  | Reconstitution solution            | Solution de reconstitution                |
|  | Polyethylene glycol                | Glycol Polyéthylène                       |
|  | Extraction solution                | Solution d'extraction                     |
|  | Elution solution                   | Solution d'élution                        |
|  | Bond Elut Silica cartridges        | Cartouches Bond Elut Silica               |
|  | Pre-treatment solution             | Solution de pré-traitement                |
|  | Neutralization solution            | Solution de neutralisation                |
|  | Tracer buffer                      | Tampon traceur                            |
|  | Microtiterplate                    | Microplaque de titration                  |
|  | HRP Conjugate                      | HRP Conjugué                              |
|  | HRP Conjugate                      | HRP Conjugué                              |
|  | HRP Conjugate concentrate          | HRP Conjugué concentré                    |
|  | HRP Conjugate concentrate          | HRP Conjugué concentré                    |
|  | Conjugate buffer                   | Tampon conjugué                           |
|  | Chromogenic TMB concentrate        | Chromogène TMB concentré                  |
|  | Chromogenic TMB solution           | Solution chromogène TMB                   |
|  | Substrate buffer                   | Tampon substrat                           |
|  | Stop solution                      | Solution d'arrêt                          |
|  | Incubation serum                   | Sérum d'incubation                        |
|  | Buffer                             | Tampon                                    |
|  | AP Conjugate                       | AP Conjugué                               |
|  | Substrate PNPP                     | Tampon PNPP                               |
|  | Biotin conjugate concentrate       | Biotine conjugué concentré                |
|  | Avidine HRP concentrate            | Avidine HRP concentré                     |
|  | Assay buffer                       | Tampon de test                            |
|  | Biotin conjugate                   | Biotine conjugué                          |
|  | Specific Antibody                  | Anticorps spécifique                      |
|  | Streptavidin HRP concentrate       | Concentré streptavidine HRP               |
|  | Non-specific binding               | Liant non spécifique                      |
|  | 2nd Antibody                       | Second anticorps                          |
|  | Acidification Buffer               | Tampon d'acidification                    |

|  | <u>Gebruikte symbolen</u>                    | <u>Gebrauchte Symbolen</u>  |
|--|----------------------------------------------|-----------------------------|
|  | Raadpleeg de gebruiksaanwijzing              | Gebrauchsanweisung beachten |
|  | Bewaartemperatuur                            | Lagern bei                  |
|  | Houdbaar tot                                 | Verwendbar bis              |
|  | Lotnummer                                    | Chargenbezeichnung          |
|  | Catalogusnummer                              | Bestellnummer               |
|  | Controle                                     | Kontrolle                   |
|  | Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek | In Vitro Diagnostikum       |
|  | Fabrikant                                    | Hersteller                  |
|  | Inhoud voldoende voor <n> testen             | Ausreichend für <n> Ansätze |
|  | Wasoplossing, geconcentreerd                 | Waschlösung-Konzentrat      |
|  | Nulkalibrator                                | Null kalibrator             |
|  | Kalibrator #                                 | Kalibrator #                |
|  | Controle #                                   | Kontrolle #                 |
|  | Tracer                                       | Tracer                      |
|  | Tracer                                       | Tracer                      |
|  | Tracer geconcentreerd                        | Tracer Konzentrat           |
|  | Tracer geconcentreerd                        | Tracer Konzentrat           |
|  | Buisjes                                      | Röhrchen                    |
|  | Incubatiebuffer                              | Inkubationspuffer           |
|  | Acetonitrile                                 | Azetonitril                 |
|  | Serum                                        | Humanserum                  |
|  | Specimen diluent                             | Probenverdünner             |
|  | Verdunningsbuffer                            | Verdünnungspuffer           |
|  | Antiserum                                    | Antiserum                   |
|  | Immunoabsorbent                              | Immunadsorbens              |
|  | Kalibratorverdunner                          | Kalibratorverdünnung        |
|  | Reconstitutieoplossing                       | Rekonstitutionslösung       |
|  | Polyethyleen glycol                          | Polyethylenglykol           |
|  | Extractieoplossing                           | Extraktionslösung           |
|  | Elutieoplossing                              | Eluierungslösung            |
|  | Bond Elut Silica kolom                       | Bond Elut Silikakartuschen  |
|  | Pre-behandelingsoplossing                    | Vorbehandlungslösung        |
|  | Neutralisatieoplossing                       | Neutralisierungslösung      |
|  | Tracerbuffer                                 | Tracer-Puffer               |
|  | Microtiterplaat                              | Mikrotiterplatte            |
|  | HRP Conjugaat                                | HRP Konjugat                |
|  | HRP Conjugaat                                | HRP Konjugat                |
|  | HRP Conjugaat geconcentreerd                 | HRP Konjugat Konzentrat     |
|  | HRP Conjugaat geconcentreerd                 | HRP Konjugat Konzentrat     |
|  | Conjugaat buffer                             | Konjugatpuffer              |
|  | Chromogene TMB geconcentreerd                | Chromogenes TMB Konzentrat  |
|  | Chromogene Oplossing TMB                     | Farblösung TMB              |
|  | Substraatbuffer                              | Substratpuffer              |
|  | Stopoplossing                                | Stopplösung                 |
|  | Incubatieserum                               | Inkubationsserum            |
|  | Buffer                                       | Puffer                      |
|  | AP Conjugaat                                 | AP Konjugat                 |
|  | Substraat PNPP                               | Substrat PNPP               |
|  | Geconcentreerd Biotine conjugaat             | Biotin-Konjugat-Konzentrat  |
|  | Geconcentreerd Avidine-HRP conjugaat         | Avidin-HRP-Konzentrat       |
|  | Assay buffer                                 | Assaypuffer                 |
|  | Biotine conjugaat                            | Biotin-Konjugat             |
|  | Specifiek antilichaam                        | Spezifischer Antikörper     |
|  | Streptavidine-HRP concentraat                | HRP Streptavidinkonzentrat  |
|  | Aspecifieke binding                          | Unspezifische Bindung       |
|  | 2de antilichaam                              | Sekundärer Antikörper       |
|  | Verzuringbuffer                              | Ansäuerungspuffer           |

|  | <u><b>Simboli utilizzati</b></u>        | <u><b>Símbolos utilizados</b></u>            |
|--|-----------------------------------------|----------------------------------------------|
|  | Consultare le istruzioni per l'uso      | Consultar las instrucciones de uso           |
|  | Limitazioni di temperatura              | Limitación de temperatura                    |
|  | Utilizzare entro                        | Fecha de caducidad                           |
|  | Numero di lotto                         | Código de lote                               |
|  | Numero di catalogo                      | Número de catálogo                           |
|  | Controllo                               | Control                                      |
|  | Dispositivo medico-diagnostico in vitro | Producto sanitario para diagnóstico in vitro |
|  | Fabbricante                             | Fabricante                                   |
|  | Contenuto sufficiente per <n> saggi     | Contenido suficiente para <n> ensayos        |
|  | Tampone di lavaggio concentrato         | Solución de lavado concentrada               |
|  | Calibratore zero                        | Calibrador cero                              |
|  | Standard #                              | Calibrador #                                 |
|  | Controllo #                             | Control #                                    |
|  | Marcato                                 | Trazador                                     |
|  | Marcato                                 | Trazador                                     |
|  | Marcato concentrato                     | Trazador concentrada                         |
|  | Marcato concentrato                     | Trazador concentrada                         |
|  | Provette                                | Tubos                                        |
|  | Tampone incubazione                     | Tampón de incubación                         |
|  | Acetonitrile                            | Acetonitrilo                                 |
|  | Siero                                   | Suero                                        |
|  | Diluente campione                       | Diluyente de Muestra                         |
|  | Tampone diluizione                      | Tampón de dilución                           |
|  | Antisiero                               | Antisuero                                    |
|  | Immunoassorbente                        | Inmunoadsorbente                             |
|  | Diluente calibratore                    | Diluyente de calibrador                      |
|  | Soluzione di ricostituzione             | Solución de Reconstitución                   |
|  | Polietilenglicole                       | Glicol Polietileno                           |
|  | Soluzione di estrazione                 | Solución de extracción                       |
|  | Soluzione di eluizione                  | Solución de elución                          |
|  | Cartucce di silice bond elut            | Cartuchos Bond Elut Silica                   |
|  | Soluzione di pretrattamento             | Solución de Pre-tratamiento                  |
|  | Soluzione di neutralizzazione           | Solución de Neutralización                   |
|  | Tracer Buffer                           | Tampón de trazador                           |
|  | Piastra di microtitolazione             | Placa de microvaloración                     |
|  | HRP Coniugato                           | HRP Conjugado                                |
|  | HRP Coniugato                           | HRP Conjugado                                |
|  | HRP Coniugato concentrato               | HRP Conjugado concentrada                    |
|  | HRP Coniugato concentrato               | HRP Conjugado concentrada                    |
|  | Buffer coniugato                        | Tampón de Conjugado                          |
|  | Cromogena TMB concentrato               | Cromógena TMB concentrada                    |
|  | Soluzione cromogena TMB                 | Solución Cromógena TMB                       |
|  | Tampone substrato                       | Tampón de sustrato                           |
|  | Soluzione di arresto                    | Solución de Parada                           |
|  | Incubazione con siero                   | Suero de Incubación                          |
|  | Buffer                                  | Tampón                                       |
|  | AP Coniugato                            | AP Conjugado                                 |
|  | Substrato PNPP                          | Sustrato PNPP                                |
|  | Concentrato coniugato con biotina       | Concentrado de conjugado de biotina          |
|  | Concentrato avidina HRP                 | Concentrado avidina-HRP                      |
|  | Soluzione tampone per test              | Tampón de ensayo                             |
|  | Coniugato con biotina                   | Conjugado de biotina                         |
|  | Anticorpo Specifico                     | Anticuerpo específico                        |
|  | Streptavidina-HRP concentrata           | Estreptavidina-HRP Concentrado               |
|  | Legame non-specifico                    | Unión no específica                          |
|  | 2° Anticorpo                            | Segundo anticuerpo                           |
|  | Tampone Acidificante                    | Tampón de Acidificación                      |

|  | <u><b>Símbolos utilizados</b></u>          | <u><b>Använda symboler</b></u>        |
|--|--------------------------------------------|---------------------------------------|
|  | Consulte instruções de utilização          | Läs instruktionerna före användning   |
|  | Temperatura de conservação                 | Förvaringstemperatur                  |
|  | Utilizar antes de                          | Används av                            |
|  | Código de lote                             | Lotnummer                             |
|  | Número de catálogo                         | Katalognummer                         |
|  | Controlo                                   | Kontroll                              |
|  | Dispositivo médico de diagnóstico in vitro | In vitro diagnostiskt kit             |
|  | Fabricante                                 | Tillverkare                           |
|  | Conteúdo suficiente para <n> testes        | Innehållet räcker till <n> prover     |
|  | Solução de lavagem concentrada             | Tvättlösning, koncentrerad            |
|  | Calibrador zero                            | Nollkalibrerare                       |
|  | Calibrador #                               | Kalibrator #                          |
|  | Controlo #                                 | Kontroll #                            |
|  | Marcador                                   | Radioisotop, antigen                  |
|  | Marcador                                   | Radioisotop, antikropp                |
|  | Marcador concentrada                       | Radioisotop, antigen koncentrerad     |
|  | Marcador concentrada                       | Radioisotop, antikropp koncentrerad   |
|  | Tubos                                      | Rör                                   |
|  | Tampão de incubação                        | Inkuberingsbuffert                    |
|  | Acetonitrilo                               | Acetonitril                           |
|  | Soro                                       | Serum                                 |
|  | Diluidor de espécimes                      | Spädningsbuffert för prover           |
|  | Tampão de diluição                         | Spädningsbuffert                      |
|  | Anti-soro                                  | Antiserum                             |
|  | Imunoadsorvente                            | Immunoadsorberare                     |
|  | Diluyente do calibrador                    | Kalibratordiluent                     |
|  | Solução de Reconstituição                  | Rekonstitutionslösning                |
|  | Polietileno-glicol                         | Polyetylen glykol                     |
|  | Solução de Extracção                       | Extraktionslösning                    |
|  | Solução de Eluição                         | Elueringslösning                      |
|  | Cartuchos de sílica Bond Elut              | Silikonpatroner för elueringsbindning |
|  | Solução de pré-tratamento                  | Förbehandlingslösning                 |
|  | Solução de neutralização                   | Neutraliseringslösning                |
|  | Tampão Marcador                            | Tracerbuffert                         |
|  | Placa de micro titulação                   | Microtiterplatta                      |
|  | HRP Conjugação                             | HRP-konjugat                          |
|  | HRP Conjugação                             | HRP-konjugat                          |
|  | HRP Conjugação concentrada                 | HRP-konjugat-koncentrat               |
|  | HRP Conjugação concentrada                 | HRP-konjugat-koncentrat               |
|  | Conjuge o tampão                           | Konjugatbuffert                       |
|  | Cromogénica TMB concentrada                | Kromogeniskt TMB-koncentrat           |
|  | Solução Cromogénica TMB                    | Kromogenisk TMB-lösning               |
|  | Tampão de substrato                        | Substratbuffert                       |
|  | Solução de Paragem                         | Stopplösning                          |
|  | Soro de incubação                          | Inkubationsserum                      |
|  | Tampão                                     | Buffert                               |
|  | AP Conjugação                              | AP-konjugat                           |
|  | Substrato PNPP                             | Substrat-PNPP                         |
|  | Concentrado conjugado de biotina           | Biotinkonjugat koncentrat             |
|  | Concentrado HRP de avidina                 | Avidin HRP-koncentrat                 |
|  | Tampão de ensaio                           | Provbuffert                           |
|  | Conjugado de biotina                       | Biotinkonjugat                        |
|  | Anticorpo específico                       | -                                     |
|  | Estreptavidina HRP concentrado             | -                                     |
|  | Ligações não específicas                   | -                                     |
|  | Anticorpo secundário                       | -                                     |
|  | Tampão de acidificação                     | -                                     |

|  | <u><b>Επεξήγηση συμβόλων</b></u>                 | <u><b>Anvendte symboler</b></u>               |
|--|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|  | Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης                | Læs brugsvejledningen                         |
|  | Θερμοκρασία αποθήκευσης                          | Opbevaringstemperatur                         |
|  | Ημερομηνία λήξης                                 | Anvend inden                                  |
|  | Αριθμός παρτίδας                                 | Batchkode                                     |
|  | Αριθμός καταλόγου                                | Katalognummer                                 |
|  | Πρότυπο ελέγχου                                  | Kontrol                                       |
|  | In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν     | Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering |
|  | Κατασκευαστής                                    | Fabrikant                                     |
|  | Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις            | Indeholder nok til <n> test                   |
|  | Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης                    | Koncentreret vaskeopløsning                   |
|  | Μηδενικός βαθμονομητής                           | Nul-kalibrator                                |
|  | Βαθμονομητής #                                   | Kalibrator nr.                                |
|  | Ορός ελέγχου #                                   | Kontrol nr.                                   |
|  | Ιχνηθέτης                                        | Markør                                        |
|  | Ιχνηθέτης                                        | Markør                                        |
|  | Χρωμογόνος Ιχνηθέτης                             | Koncentreret markør                           |
|  | Χρωμογόνος Ιχνηθέτης                             | Koncentreret markør                           |
|  | Σοληνάρια                                        | Tuber                                         |
|  | Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης                       | Inkubationsbuffer                             |
|  | Ακετονιτρίλιο                                    | Acetonitril                                   |
|  | Ορός                                             | Serum                                         |
|  | Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων                       | Prøvediluent                                  |
|  | Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης                      | Fortyndingsbuffer                             |
|  | Αντιορός                                         | Antiserum                                     |
|  | Ανοσοπροσροφητικό                                | Immonoadsorbent                               |
|  | Αραιωτικό βαθμονομητών                           | Kalibratordiluent                             |
|  | Διάλυμα ανασύστασης                              | Rekonstitueringsopløsning                     |
|  | Πολυαιθυλενογλυκόλη                              | Polyetylglykol                                |
|  | Διάλυμα εκχύλισης                                | Ekstraktionsopløsning                         |
|  | Διάλυμα έκλουσης                                 | Elueringsopløsning                            |
|  | Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut                      | Patroner med bindingselueringssilica          |
|  | Διάλυμα προεπεξεργασίας                          | Forbehandlingsopløsning                       |
|  | Διάλυμα εξουδετέρωσης                            | Neutraliseringsopløsning                      |
|  | Ρυθμιστικό διάλυμα                               | Markørbuffer                                  |
|  | Πλάκα μικροτιτλοδότησης                          | Mikrotiterplade                               |
|  | HRP Σύζευγμα                                     | HRP-konjugat                                  |
|  | HRP Σύζευγμα                                     | HRP-konjugat                                  |
|  | Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα                          | HRP-konjugat-koncentreret                     |
|  | Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα                          | HRP-konjugat-koncentreret                     |
|  | Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος                   | Konjugatbuffer                                |
|  | Χρωμογόνος TMB                                   | Kromogen TMB-koncentreret                     |
|  | Διάλυμα χρωμογόνου TMB                           | Kromogen TMB-opløsning                        |
|  | Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος                  | Substratbuffer                                |
|  | Ανασχετικό αντιδραστήριο                         | Stopopløsning                                 |
|  | Ορός επώασης                                     | Inkubationsserum                              |
|  | Ρυθμιστικό διάλυμα                               | Buffer                                        |
|  | AP Σύζευγμα                                      | AP-konjugat                                   |
|  | PNPP υποστρώματος                                | Substrat PNPP                                 |
|  | Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη | Biotin konjugat koncentrat                    |
|  | Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP                | Avidin HRP koncentrat                         |
|  | Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού                 | Prøvebuffer                                   |
|  | αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη              | Biotin konjugat                               |
|  | Ειδικό Αντίσωμα                                  | -                                             |
|  | Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP   | -                                             |
|  | μη-ειδική δέσμευση                               | -                                             |
|  | 2ο Αντίσωμα                                      | -                                             |
|  | Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο                         | -                                             |

|  | <b><u>Stosowane symbole</u></b>                   | <b><u>Használt szimbólumok</u></b>      |
|--|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|
|  | Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją     | Olvassa el a használati útmutatót       |
|  | Temperatura przechowywania                        | Tárolási hőmérséklet                    |
|  | Zużyć przed                                       | Lejáratí idő                            |
|  | Kod serii                                         | Gyártási kód                            |
|  | Numer katalogowy                                  | Katalógus szám                          |
|  | Kontrola                                          | Kontrol                                 |
|  | Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro       | In vitro diagnosztikai eszköz           |
|  | Producent                                         | Gyártó                                  |
|  | Zawartość wystarczająca do <n> testów             | Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő |
|  | Roztwór płuczący stężony                          | Mosó folyadék koncentrátum              |
|  | Kalibrator zerowy                                 | Zero kalibrátor                         |
|  | Kalibrator nr                                     | Kalibrátor #                            |
|  | Kontrola nr                                       | Kontrol #                               |
|  | Znacznik izotopowy                                | Nyomjelző izotóp                        |
|  | Znacznik izotopowy                                | Nyomjelző izotóp                        |
|  | Znacznik izotopowy stężony                        | Nyomjelző izotóp koncentrátum           |
|  | Znacznik izotopowy stężony                        | Nyomjelző izotóp koncentrátum           |
|  | Probówki                                          | Csővek                                  |
|  | Wymagana inkubacja buforu                         | Inkubáló puffer                         |
|  | Acetonitryl                                       | Acetonitril                             |
|  | Surowica                                          | Szérum                                  |
|  | Rozcieńczalnik próbki                             | Mintahígító                             |
|  | Bufor do rozcieńczania                            | Hígító puffer                           |
|  | Antysurowica                                      | Antiszérum                              |
|  | Immunoabsorbent                                   | Immunadszorbens                         |
|  | Rozcieńczalnik kalibratora                        | Kalibrátor hígító                       |
|  | Roztwór do rozcieńczania                          | Mintaelőkészítő oldat                   |
|  | Glikol poli(oksy)etylenowy                        | Polietilén glikol                       |
|  | Roztwór ekstrakcyjny                              | Extrakciós oldat                        |
|  | Roztwór elucyjny                                  | Eluáló oldat                            |
|  | Kolumny krzemionkowe Bond Elut                    | Bond Elut Silica szilikagél patronok    |
|  | Roztwór do przygotowania wstępnego                | Előkezelő oldat                         |
|  | Roztwór neutralizujący                            | Semlegesítő oldat                       |
|  | Bufor znacznika                                   | Nyomjelző izotóp hígító puffer          |
|  | mikro płytki                                      | Mikrotiter lemez                        |
|  | Koniugat peroksydazy chrzanowej                   | HRP konjugátum                          |
|  | Koniugat peroksydazy chrzanowej                   | HRP konjugátum                          |
|  | Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej       | HRP konjugátum koncentrátum             |
|  | Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej       | HRP konjugátum koncentrátum             |
|  | Bufor do koniugacji                               | Konjugátum puffer                       |
|  | Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzodyny) | Kromogén TMB koncentrátum               |
|  | Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)    | Kromogén TMB oldat                      |
|  | Bufor substratu                                   | Szubsztrát puffer                       |
|  | Roztwór zatrzymujący reakcję                      | Stop oldat                              |
|  | Wymagana inkubacja surowicy                       | Inkubációs szérum                       |
|  | Bufor                                             | Puffer                                  |
|  | Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)               | AP konjugátum                           |
|  | p-nitrofenylofosforan substratowy                 | Szubsztrát PNPP                         |
|  | Koncentrat koniugatu biotyny                      | Biotin konjugátum koncentrátum          |
|  | Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną       | Avidin HRP koncentrátum                 |
|  | Bufor do oznaczania                               | Vizsgálati puffer                       |
|  | Koniugatu biotyny                                 | Biotin konjugátum                       |
|  | Przeciwciało swoiste                              | Specifikus ellenanyag                   |
|  | Koncentrat streptawidyny HRP                      | Sztreptawidin HRP koncentrátum          |
|  | Wiązanie nieswoiste                               | Nem-specifikus kötődés                  |
|  | Drugie przeciwciało                               | Másodlagos ellenanyag                   |
|  | Bufor zakwaszający                                | Savas puffer                            |



|                 | <b><u>Използвани символи</u></b>             |
|-----------------|----------------------------------------------|
|                 | Вижте инструкцията за работа                 |
|                 | Температура на съхранение                    |
|                 | Използвайте с                                |
| <b>LOT</b>      | Партиден код                                 |
| <b>REF</b>      | Каталожен номер                              |
| <b>CONTROL</b>  | Контрол                                      |
| <b>IVD</b>      | Ин витро диагностично медицинско изделие     |
|                 | Производител                                 |
|                 | Съдържание достатъчно за <n> теста           |
| WASH SOLN CONC  | Концентриран измиващ разтвор                 |
| CAL 0           | Нулев калибратор                             |
| CAL N           | Калибратор #                                 |
| CONTROL N       | Контрол #                                    |
| Ag 125I         | Трейсър                                      |
| Ab 125I         | Трейсър                                      |
| Ag 125I CONC    | Концентриран маркер                          |
| Ab 125I CONC    | Концентриран маркер                          |
|                 | Епруветки                                    |
| INC BUF         | Инкубационен буфер                           |
| ACETONITRILE    | Ацетонитрил                                  |
| SERUM           | Серум                                        |
| DIL SPE         | Разредител за пробите                        |
| DIL BUF         | Буфер за разреждане                          |
| ANTISERUM       | Антисерум                                    |
| IMMUNOABSORBENT | Имуноабсорбент                               |
| DIL CAL         | Разредител за калибратора                    |
| REC SOLN        | Пресъздаващ разтвор                          |
| PEG             | Полиетилен гликол                            |
| EXTR SOLN       | Екстрактов разтвор                           |
| ELU SOLN        | Разтвор за елюиране                          |
| GEL             | Силикагелни пълнители                        |
| PRE SOLN        | Пред-лечебен разтвор                         |
| NEUTR SOLN      | Неутрализиращ разтвор                        |
| TRACEUR BUF     | Маркерен буфер                               |
|                 | Микротитърна пластина                        |
| Ab HRP          | HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза |
| Ag HRP          | HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза |
| Ab HRP CONC     | HRP конюгиран концентрат                     |
| Ag HRP CONC     | HRP конюгиран концентрат                     |
| CONJ BUF        | Буфер за конюгата                            |
| CHROM TMB CONC  | Хромогенен ТМВ концентрат                    |
| CHROM TMB       | Хромогенен ТМВ разтвор                       |
| SUB BUF         | Субстратен буфер                             |
| STOP SOLN       | Стоп разтвор                                 |
| INC SER         | Инкубационен серум                           |
| BUF             | Буфер                                        |
| Ab AP           | AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза    |
| SUB PNPP        | Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат       |
| BIOT CONJ CONC  | Биотин конюгиран концентрат                  |
| AVID HRP CONC   | Авидин HRP концентрат                        |
| ASS BUF         | Буфер за пробите                             |
| Ab BIOT         | Биотин конюгат                               |
| Ab              | специфично антитяло                          |
| SAV HRP CONC    | стрептавидин HRP концентрат                  |
| NSB             | не специфично свързване                      |
| 2nd Ab          | второ антитяло                               |
| ACID BUF        | киселинизиращ буфер                          |