



# CanAg NSE EIA

Prod. Nr. 420-10

Gebrauchsanweisung  
2009-11

Enzym-Immunoassay-Kit  
Für 96 Bestimmungen

## VERWENDUNGSZWECK

Das CanAg NSE EIA Kit ist für die quantitative Bestimmung von NSE im Humanserum vorgesehen.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES ASSAY

Die glykolytische Enzym-Enolase (2-Phospho-D-Glycerathydrolase, EC 4.2.1.11) existiert in Form von verschiedenen dimetrischen Isoenzymen ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$  und  $\gamma\gamma$ ), die sich aus drei verschiedenen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zusammensetzen. Die  $\gamma$ -Einheit findet sich entweder in einem homologen  $\gamma\gamma$ - oder in einem heterologen  $\alpha\gamma$ -Isoenzym und ist als neuronenspezifische Enolase (NSE) bekannt. Die monoklonalen Antikörper im CanAg NSE EIA binden an der  $\gamma$ -Untereinheit, und daher können die  $\gamma\gamma$ - und  $\alpha\gamma$ -Formen nachgewiesen werden (1,2). Die NSE-Konzentrationen sind beim gesunden Menschen sowie bei Patienten mit gutartigen Erkrankungen niedrig. Erhöhte Konzentrationen finden sich häufig bei Patienten mit malignen Tumoren mit neuroendokriner Differenzierung, insbesondere beim kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC) (3) sowie beim Neuroblastom (4). Die quantitative Bestimmung von NSE im Serum kann bei der Behandlung von Patienten mit Verdacht auf oder diagnostiziertem SCLC oder Neuroblastom wertvoll sein, um die Diagnose zu bestätigen, die Wirkung der Behandlung zu überwachen und die Feststellung eines erneuten Auftretens der Krankheit zu unterstützen.

## PRINZIP DES TESTS

Der CanAg NSE EIA ist ein nichtkompetitiver Festphasen-gekoppelter Immunoassay auf der Basis zweier monoklonaler Antikörper (aus Maus), die gegen zwei separate Antigendeterminanten des NSE-Moleküls gerichtet werden. Die verwendeten monoklonalen Antikörper (MAb) binden an der  $\gamma$ -Untereinheit des Enzyms und ermöglichen daher den Nachweis der  $\gamma\gamma$ - und  $\alpha\gamma$ -Form. Kalibratoren und Patientenproben werden zusammen mit biotinyliertem Anti-NSE MAb E21 und Meerrettichperoxidase (HRP)-markiertem Anti-NSE MAb E17 in Streptavidin-beschichteten Mikrotiter-Streifen inkubiert. Nach dem Waschen wird das gepufferte Substrat/Chromogen-Reagens (Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zu jedem Well zugegeben, um die Enzymreaktion einzuleiten. Während der Enzymreaktion entwickelt sich eine

blaue Farbe, sofern das Antigen vorhanden ist. Die Intensität der Farbentwicklung ist proportional zu der Menge des NSE in den Proben.

Die Farbintensität wird in einem Mikrotiterplatten-Spektrofotometer bei 620 nm (oder wahlweise bei 405 nm nach Zugabe einer Stopplösung) bestimmt.

Eichkurven werden für jeden Assay durch Auftragen des Absorbanzwertes gegenüber der Konzentration für jeden Kalibrator erstellt. Die NSE-Konzentrationen der Patientenproben werden dann aus der Eichkurve abgelesen.

## REAGENZIEN

- Jedes CanAg NSE EIA Kit enthält Reagenzien für 96 Tests.
- Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Etikett an der Außenseite des Kit-Behälters angegeben.
- Das Kit darf nicht über das Verfallsdatum hinaus verwendet werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kit-Chargen dürfen nicht gemischt werden.
- Das Kit muss bei 2-8° C aufbewahrt werden. Nicht einfrieren.
- Angebrochene Reagenzien sind gemäß der folgenden Tabelle stabil, sofern sie nicht verunreinigt sind und in dem wieder verschlossenen Originalbehälter aufbewahrt und gemäß Anleitung behandelt werden. Unmittelbar nach dem Gebrauch bei 2-8° C aufbewahren.

Komponente	Menge	Aufbewahrung und Stabilität nach dem ersten Öffnen
<b>MICROPLA</b> Streptavidin-Mikrotiterplatte	1 Platte	2–8° C bis zu dem auf der Platte angegebenen Verfallsdatum

12 x 8 aufbrechbare Wells, beschichtet mit Streptavidin. Nicht benötigte Streifen nach dem Öffnen sofort wieder in den Aluminiumbeutel mit Trockenmittel geben und diesen sorgfältig verschließen, damit keine Feuchtigkeit eindringt.

Komponente	Menge	Aufbewahrung und Stabilität nach dem ersten Öffnen
------------	-------	---

**NSE-Kalibratoren** 5 Fläschchen,  
lyophilisiert 4 Wochen bei 2–8° C  
3 Monate bei –20° C

CAL	NSE	A
-----	-----	---

1 x 0,75 ml

CAL	NSE	B
-----	-----	---

1 x 0,75 ml

CAL	NSE	C
-----	-----	---

1 x 0,75 ml

CAL	NSE	D
-----	-----	---

1 x 0,75 ml

CAL	NSE	E
-----	-----	---

1 x 0,75 ml

Die lyophilisierten Kalibratoren enthalten Human-NSE in einer Proteinmatrix mit 0,01 % azidfreien antimikrobiellen Konservierungsmittel. Vor dem Gebrauch mit 0.75 mL destilliertem Wasser rekonstituieren.

**HINWEIS:** Die exakte NSE-Konzentration ist chargenspezifisch und auf dem Etikett des einzelnen Fläschchens angegeben.

BIOTIN	Anti-NSE
--------	----------

**Biotin Anti-NSE** 1 x 15 ml 2–8° C bis zu dem auf dem  
Fläschchen angegebenen  
Verfallsdatum

Biotin Anti-NSE monoklonaler Antikörper aus Maus, etwa 2 µg/ml. Enthält Phosphatpuffer (pH 7,1), bovines Serumalbumin, Blockierungsmittel, einen inerten blauen Farbstoff und 0,01 % Methylisothiazolon (MIT) als Konservierungsmittel. Vor dem Gebrauch mit Tracer, HRP Anti-NSE mischen.

CONJ	Anti-NSE
------	----------

**Tracer, HRP Anti-NSE** 1 x 0,75 ml 2–8° C bis zu dem auf dem  
Fläschchen angegebenen  
Verfallsdatum

Vorratslösung aus HRP Anti-NSE monoklonalem Antikörper aus Maus, etwa 40 µg/ml. Vor dem Gebrauch mit Biotin Anti-NSE mischen. Enthält 0,02 % Methylisothiazolon (MIT), 0,02 % Bromnitrodioxan und 20 ppm Proclin™ 300 als Konservierungsmittel.

Komponente	Menge	Aufbewahrung und Stabilität nach dem ersten Öffnen
------------	-------	---

**SUBS** | **TMB**

<b>TMB HRP-Substrat</b>	1 x 12 ml	2–8° C bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum
-------------------------	-----------	--

Gebrauchsfertig. Enthält gepuffertes Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB).

**STOP**

<b>Stopplösung</b>	1 x 15 ml	2–8° C bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum
--------------------	-----------	--

Gebrauchsfertig. Enthält 0,12 M Chlorwasserstoffsäure.

**WASHBUF** | **25X**

<b>Waschkonzentrat</b>	1 x 50 ml	2–8° C bis zu dem auf der Flasche angegebenen Verfallsdatum
------------------------	-----------	---

Vor dem Gebrauch mit Wasser 1:25 verdünnen. Eine Tris-HCl-gepufferte Salzlösung mit Tween 20.  
Enthält Germall II als Konservierungsmittel.

### Anzeichen für Instabilität

Das TMB HRP-Substrat muss farblos oder leicht bläulich sein. Eine blaue Färbung deutet darauf hin, dass das Reagens verunreinigt wurde und zu entsorgen ist.

### WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zur in vitro-Diagnostik zu verwenden

- Nur für den professionellen Gebrauch
- Für die Sicherheit im Labor lesen Sie bitte Publikation: U.S.Department of Health and Human Services (Bethesda,MD,USA/ No.(CDC) 88-8395) oder kontaktieren Sie Ihre lokale/nationale Behörde.
- Behandeln Sie sämtliche Proben mit Vorsicht – Sie sind potentiell infektiös.
- Chemikalien und Zubereitungen, die als Reststoffe anfallen, sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen des Bundes und der Länder. Die zuständige Behörde oder Abfallbeseitigungsunternehmen informieren über die Entsorgung von Sonderabfällen.

## **Achtung**

Jede Spendereinheit, die bei der Zubereitung von Reagenzien humanen Ursprungs zum Einsatz kommt, wurde getestet und auf HIV-1/2-Antikörper, HCV-Antikörper und Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) negativ befunden. Da keine Testmethode das Vorliegen von hämatogenen Erkrankungen vollständig ausschließen kann, ist beim Umgang mit und bei der Entsorgung von Reagenzien humanen Ursprungs aus diesem Produkt stets davon auszugehen, dass sie potenziell infektiös sind.

## **PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG**

Der CanAg NSE EIA ist für die Verwendung mit Serum vorgesehen. Blut durch Venenpunktion entnehmen und das Serum nach üblichen Verfahren separieren. Das Serum sollte innerhalb von 60 Minuten nach der Entnahme von dem Gerinnsel abgetrennt werden, um das Austreten von NSE aus den Blutzellen zu vermeiden. Keine hämolysierten Proben verwenden. Plasma wird nicht empfohlen, da signifikante Mengen von NSE aus den Plättchen freigesetzt werden können. Die Proben können bei 2 - 8° C über 24 Stunden aufbewahrt werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten darf die Temperatur maximal -70° C betragen. Die Proben sollten nicht in einem Gefrierschrank mit automatischer Abtaufunktion aufbewahrt oder vor der Analyse aufgetaut und wieder eingefroren werden. Lassen Sie die gefrorenen Proben Raumtemperatur annehmen und mischen Sie vor der Analyse GRÜNDLICH durch mehrmaliges vorsichtiges Umdrehen. Proben, die grobe Partikel aufweisen, müssen vor der Verwendung 10 Minuten lang bei 10.000 x g zentrifugiert werden, um sämtliche Partikel zu entfernen, die sich möglicherweise beim Auftauvorgang gebildet haben. Analysieren Proben innerhalb von 1 Stunde.

## **VERFAHREN**

### **Materialien, die benötigt werden, aber im Kit nicht enthalten sind**

#### **1. Mikrotiterplatten-Schüttelapparat**

Das Schütteln muss mäßig bis stark erfolgen. Schütteln in Längsrichtung bei etwa 200 Hüben/min, 700 - 900 Schwingungen/min.

#### **2. Mikrotiterplatten-Waschvorrichtung**

Waschen der Platte wahlweise vollautomatisch durch 1 und 6 Waschzyklen, oder mit einer halbautomatischen Mikroplatten-Waschvorrichtung, die an eine Vakuumpumpe oder eine Wasserstrahl-Vakuumpumpe und ein Auffanggefäß für die abgesaugte Flüssigkeit angeschlossen ist. Wird kein automatisches Mikroplatten-Waschgerät eingesetzt, empfiehlt sich die Verwendung des manuellen Waschgerätes Nunc Immuno-8.

#### **3. Mikrotiterplatten-Spektrofotometer**

Mit einer Wellenlänge von 620 nm und/oder 405 nm und einem Absorbanzbereich von 0 bis 3,0.

#### **4. Präzisionspipetten**

Mit Einmal-Kunststoffspitzen zum Abziehen von Mikrotitervolumen. Eine 8-Kanal-Pipette oder eine Responder-Pipette mit Einmal-Kunststoffspitzen zur Abgabe von 100 µl ist sinnvoll, aber nicht zwingend erforderlich. Pipetten zum Abziehen von Millilitervolumen.

## 5. Destilliertes oder vollentsalztes Wasser

Zum Rekonstituieren der NSE-Kalibratoren und für die Zubereitung der verdünnten Waschlösung.

### Hinweise zum Verfahren

1. Ein gründliches Verständnis dieser Gebrauchsanweisung ist erforderlich, um eine ordnungsgemäße Verwendung des CanAg NSE EIA Kits zu gewährleisten. Die mit diesem Kit gelieferten Reagenzien sind für die Verwendung als integrierte Einheit vorgesehen. Keinesfalls dürfen identische Reagenzien aus verschiedenen Kit-Chargen gemischt werden. Die Kit-Reagenzien dürfen nicht über das auf der Außenseite des Kit-Behälters angegebene Verfallsdatum hinaus verwendet werden.
2. Die Reagenzien müssen vor dem Gebrauch Raumtemperatur (20 - 25° C) erreichen. Der Assay darf nur bei Temperaturen zwischen 20 und 25° C durchgeführt werden, um exakte Ergebnisse sicherzustellen. Eingefrorene Sera müssen nach dem Auftauen vorsichtig, aber gründlich gemischt werden.
3. Es empfiehlt sich, vor dem Pipettieren von Kalibratoren und Patientenproben die Streifen zu markieren, um die Proben während und nach der Durchführung des Assays eindeutig identifizieren zu können.
4. Die Notwendigkeit effizienten und gründlichen Waschens zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Antigen und von Reagenzien aus den an der Festphase gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexen ist einer der wichtigsten Schritte in einem EIA. Damit die Effizienz der Waschschritte sichergestellt ist, müssen Sie darauf achten, dass alle Kavitäten bei jedem Waschzyklus bis zum oberen Rand vollständig mit Waschlösung gefüllt werden, dass die Waschlösung angemessen schnell pipettiert wird, dass die Flüssigkeit zwischen und nach den Waschzyklen vollständig aus den Kavitäten abgesaugt wird und dass die Kavitäten leer sind. Sollten noch Flüssigkeitsreste vorhanden sein, drehen Sie die Platte um und klopfen sie vorsichtig auf saugfähigem Papier aus.
  - Automatische Teststreifen-Waschvorrichtung: Halten Sie die Anweisungen des Herstellers zur Reinigung und Instandhaltung genau ein und führen Sie vor und nach jedem Inkubationsschritt die vorgeschriebene Anzahl an Waschzyklen durch. Es wird dringend empfohlen, den Verarbeitungsmodus „Strip“ (Teststreifen) und den Waschmodus „Overflow“ (Überlauf) mit einem Pipettiervolumen von 800 µl zu verwenden. Die Aspirations-/Waschvorrichtung sollte nicht für längere Zeit mit der Waschlösung stehen gelassen werden, da die Nadeln verstopfen könnten, was dazu führt, dass zu wenig Flüssigkeit abgegeben und wieder abgesaugt wird.
5. Das TMB HRP-Substrat ist sehr anfällig für Verunreinigungen. Um eine optimale Stabilität des TMB HRP-Substrats zu gewährleisten, muss die erforderliche Menge aus dem Fläschchen in einen gründlich gereinigten Behälter oder vorzugsweise eine Kunststoffschale zur einmaligen Verwendung gegeben werden. Auf diese Weise lassen sich Verunreinigungen des Reagens verhindern. Unbedingt saubere Einmal-Pipettenspitzen aus Kunststoff (oder Responder-Pipettenspitzen) verwenden.

6. Unbedingt saubere Einmal-Pipettenspitzen aus Kunststoff und eine geeignete Pipettiertechnik beim Umgang mit Proben und Reagenzien verwenden. Es ist darauf zu achten, dass die Substanzen nicht verschleppt werden, indem die Pipettenspitze etwas über dem oberen Well-Rand gehalten wird. Keinesfalls den Kunststoffstreifen oder die Oberfläche der Flüssigkeit berühren. Eine geeignete Pipettiertechnik ist beim Umgang mit der TMB HRP-Substratlösung von besonderer Bedeutung.

---

<b>Zubereitung der Reagenzien</b>	<b>Stabilität des zubereiteten Reagens</b>
<b>NSE-Kalibratoren</b>	4 Wochen bei 2–8° C 3 Monate bei -20° C

Exakt 0,75 ml destilliertes Wasser in jedes Fläschchen geben und vorsichtig mischen. Zum Rekonstituieren mindestens 15 Minuten stehen lassen. **HINWEIS:** Die Konzentration der Kalibratoren ist auf den Etiketten angegeben und sollte zur Berechnung der Ergebnisse herangezogen werden.

---

<b>Waschlösung</b>	2 Wochen bei 2–25° C im verschlossenen Behälter
--------------------	--

Die 50 ml Waschkonzentrat in einen sauberen Behälter geben und durch Zugabe von 1200 ml destilliertem oder vollentsalztem Wasser 1:25 verdünnen, um eine gepufferte Waschlösung zu erhalten.

---

<b>Antikörperlösung</b>	3 Wochen bei 2–8° C
-------------------------	---------------------

Die benötigte Menge der Antikörperlösung durch Mischen von 50 µl Tracer, HRP Anti-NSE mit 1 ml Biotin Anti-NSE pro Streifen zubereiten (siehe folgende Tabelle):

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

Unbedingt eine saubere Kunststoff- oder Glasflasche für die Zubereitung der Antikörperlösung verwenden.

**Alternative:** Den Inhalt des Tracer, HRP Anti-NSE in das Fläschchen mit Biotin Anti-NSE gießen und vorsichtig mischen. Darauf achten, dass der gesamte Inhalt des Tracers in das Fläschchen mit Biotin Anti-NSE gegeben wird.

**HINWEIS:** Die Antikörperlösung ist 3 Wochen lang bei 2 - 8° C stabil. Nicht mehr als die Menge Antikörperlösung zubereiten, die innerhalb dieser Zeit verwendet wird, und unbedingt auf geeignete Aufbewahrung achten.

### Assay-Verfahren

Jede Bestimmung wird doppelt für beide Kalibratoren und Patientenproben durchgeführt. Eine Eichkurve sollte bei jedem Assay erstellt werden. Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25° C) erwärmt werden.

1. Mit der Vorbereitung von NSE-Kalibratoren, Waschlösung und Antikörperlösung beginnen. Es ist wichtig, saubere Behälter zu verwenden. Die Anleitung ist genau zu befolgen.
2. Die benötigte Anzahl Mikrotiterplatten-Streifen in einen Streifenrahmen klemmen. (Die verbleibenden Streifen sofort wieder in den Aluminiumbeutel mit dem Trockenmittel geben und diesen sorgfältig verschließen.) Jeden Streifen einmal mit der Waschlösung waschen. Es sollten nicht mehr Streifen gewaschen werden, als innerhalb von 30 Minuten verarbeitet werden können.
3. 25 µl der NSE-Kalibratoren (CAL A, B, C, D, E) und Patientenproben (unbekannt-Unb) nach dem folgenden Schema in die Streifen-Wells pipettieren:

	1	2	3	4	5	6	7 etc
A	Cal A	Cal E	4th Unb				
B	Cal A	Cal E	etc				
C	Cal B	1st Unb					
D	Cal B	1st Unb					
E	Cal C	2nd Unb					
F	Cal C	2nd Unb					
G	Cal D	3rd Unb					
H	Cal D	3rd Unb					

4. 100 µl Antikörperlösung mit einer 100 µl Präzisionspipette (oder einer 100 µl 8-Kanal-Präzisionspipette) in jeden Well verfüllen. Es ist darauf zu achten, dass die Substanzen nicht verschleppt werden, indem die Pipettenspitze leicht über dem oberen Well-Rand gehalten wird. Keinesfalls den Kunststoffstreifen oder die Oberfläche der Flüssigkeit berühren.
5. Die Platte für 1 Stunde ( $\pm$  10 min) bei Raumtemperatur (20 - 25° C) unter ständigem Schütteln der Platte mit einem Mikrotiterplatten-Schüttelgerät inkubieren.
6. Nach der Inkubation jeden Streifen sechsmal absaugen und waschen.
7. 100 µl des TMB HRP-Substrats zu jedem Well geben gemäß dem Verfahren unter Punkt 4. Das TMB HRP-Substrat sollte so schnell wie möglich in die Wells verfüllt werden, und die Zeit zwischen dem ersten und letzten Well darf nicht mehr als 5 Minuten betragen.
8. 30 Minuten ( $\pm$  5 min.) bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubieren. Keinesfalls direkter Sonneneinstrahlung aussetzen.
9. Unmittelbar die Absorbanz bei 620 nm in einem Mikrotiterplatten-Spektrofotometer ablesen.

#### Option

Wenn dem Labor kein Mikrotiterplatten-Spektrofotometer für Messungen bei 620 nm zur Verfügung steht, kann die Absorbanz bestimmt werden, wie unter Punkt 10 beschrieben.

10. 100 µl Stopplösung zugeben, mischen und die Absorbanz bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Spektrofotometer innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung ablesen.

#### Messbereich

Der CanAg NSE EIA misst Konzentrationen zwischen 1 und etwa 150 µg/l. Wenn NSE-Konzentrationen über dem Messbereich zu erwarten sind, empfiehlt es sich, die Proben vor der Analyse mit normalem humanem Serum zu verdünnen. **HINWEIS:** Das für die Verdünnung verwendete Serum muss ebenfalls gemessen werden, um die endogene NSE-Konzentration zu bestimmen (siehe "Berechnung der Ergebnisse").

### Qualitätskontrolle

Die CanChek Tumor Marker Kontroll Seren Level 1 und 2 (gesondert erhältlich unter REF 107-20) werden für die Validierung der Testserien empfohlen. Falls Werte außerhalb des angegebenen Bereichs erhalten wurden, sollten die Reagenzien sowie die Funktion des Readers überprüft und die Bestimmung wiederholt werden.

### Referenzmaterialien

Da kein übliches Referenzmaterial für das NSE-Antigen zur Verfügung steht, werden die CanAg NSE EIA Kalibratorwerte einem Set interner Referenzstandards zugewiesen.

### BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Wenn ein Mikrotiterplatten-Spektrofotometer mit eingebautem Datenberechnungsprogramm verwendet wird, ist nach dem Handbuch zum Spektrofotometer zu verfahren und ein Programm unter Verwendung der auf dem Etikett der einzelnen NSE-Kalibratoren angegebenen Konzentration zu erarbeiten.

Für die automatische Berechnung der NSE-Ergebnisse wird empfohlen, nach einer der folgenden Methoden zu verfahren:

- Kubische Splinefunktion. Kalibrator A muss in der Kurve mit dem Wert 0 µg/l enthalten sein.
- Geglättete Splinefunktion. Kalibrator A muss als Platten-Blank verwendet werden.
- Interpolation mit Punkt-zu-Punkt-Beurteilung. Kalibrator A muss in der Kurve mit dem Wert 0 µg/l enthalten sein.
- Quadratische Interpolation. Kalibrator A muss in der Kurve mit dem Wert 0 µg/l enthalten sein.

**Hinweis:** Die 4-Parameter-Methode oder die lineare Regressionsbeurteilung sollten nicht zur Anwendung kommen.

Für die manuelle Berechnung wird eine Eichkurve erstellt, indem die Absorbanz (A)-Werte, die für jeden NSE-Kalibrator ermittelt werden, gegen die entsprechende NSE-Konzentration (in µg/l) aufgetragen werden, siehe Abbildung. Die unbekanntes NSE-Konzentrationen können dann von der Standardkurve mit Hilfe des mittleren Absorbanzwertes für jede Patientenprobe abgelesen werden.

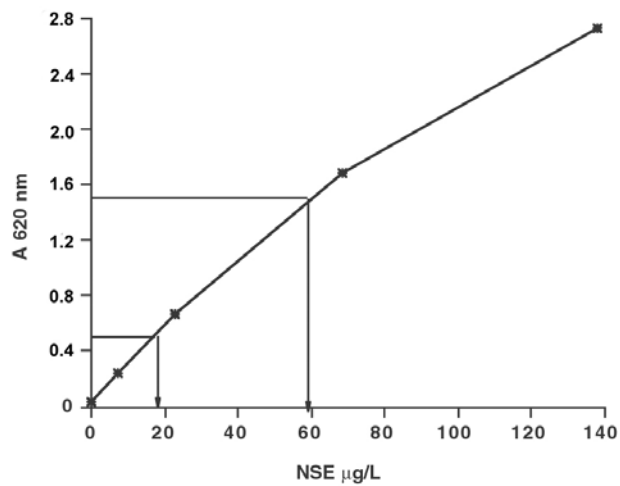
Wenn Proben in einer ersten Analyse NSE-Werte oberhalb der Konzentration des Kalibrators E ergeben, muss die Probe 1:10 mit normalem humanen Serum verdünnt werden, um exakte Ergebnisse zu erhalten. Das Ergebnis ist dann nach dem folgenden Verfahren zu berechnen:

$$\text{Verdünnung 1:10:} \quad 10 \times ([\text{NSE}]_{\text{Verdünnte Probe}} - (0,9 \times [\text{NSE}]_{\text{Normales humanes Serum}}))$$

## Ergebnisbeispiele

Probe	Kalibrator- werte	Mittlerer Abs.- wert (A)	NSE µg/l
CAL NSE A	0 µg/l	0,037	
CAL NSE B	7,5 µg/l	0,238	
CAL NSE C	22,9 µg/l	0,663	
CAL NSE D	68,4 µg/l	1,688	
CAL NSE E	138,0 µg/l	2,720	
Probe 1		0,518	17,5
Probe 2		1,474	57,8

### Beispiel für Standardkurve einfügen



*Diese Kurve dient nur als Beispiel - nicht zur Bestimmung der Assay-Ergebnisse verwenden.  
Die exakte NSE-Konzentration ist auf dem Etikett der einzelnen Kalibratorfläschchen angegeben.*

## GRENZEN DES VERFAHRENS

Die NSE-Konzentration kann nicht als absoluter Nachweis für das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer malignen Erkrankung herangezogen werden, und der NSE-Test sollte nicht im Krebs-Screening zur Anwendung kommen. Die Ergebnisse des Tests sind einzig in Verbindung mit anderen Untersuchungen und Verfahren bei der Diagnose einer Erkrankung zu interpretieren und nicht als Ersatz für anerkannte klinische Untersuchungen zu verwenden.

Erhöhte NSE-Werte, die nicht auf Tumore zurückzuführen sind, könnten bei Dialysepatienten und Patienten mit leukämischen Erkrankungen auftreten.

Das Serum darf keine sichtbare Hämolyse aufweisen (die Absorbanz bei 500 nm für nichttrübe Proben darf 0,3 nicht überschreiten), da Erythrozyten signifikante Mengen an NSE enthalten (7). Bei längerer Aufbewahrung von Vollblut kann NSE aus den Blutzellen freigesetzt werden.

Anti-Reagens-Antikörper (humaner Anti-Maus (HAMA)-Antikörper oder heterophile Antikörper) in der Patientenprobe können bisweilen den Assay beeinträchtigen, wenngleich spezifische Blockierungsmittel im Puffer enthalten sind.

## ZU ERWARTENDE WERTE

Gesunde Personen weisen voraussichtlich NSE-Werte unter 13 µg/l auf. Es wird empfohlen, dass das einzelne Labor seinen eigenen Normalbereich definiert, um lokale Umgebungsfaktoren, wie etwa Ernährung, Klima, Lebensumstände, Patientenauswahl usw. zu berücksichtigen.

## LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

### Präzision

Die Gesamtpräzision wurde gemäß der NCCLS-Richtlinie EP5-A (8) unter Verwendung von vier Konzentrationen eines gefrorenen gepoolten Humanserums, dem NSE zugegeben wurde, ermittelt. Jede Probe wurde nach dem Zufallsprinzip in Duplikate pipettiert und zweimal pro Tag über 20 Tage analysiert. Die Analysen erfolgten über einen Zeitraum von 40 Monaten, durch  $\geq 3$  verschiedene Techniker und unter Verwendung von 20 verschiedenen CanAg NSE EIA Kit-Chargen.

Probe	Wiederholungen	Mittlerer µg/l	Interassay SD (µg/l)	Interassay CV %	Intraassay SD (µg/l)	Intraassay CV %
NSE 1	80	10,3	0,24	2,3	0,57	5,5
NSE 2	80	23,7	0,82	3,5	0,97	4,1
NSE 3	80	48,2	1,02	2,1	1,93	4,0
NSE 4	80	92,7	1,60	1,7	3,44	3,7

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des CanAg NSE EIA Assays liegt bei < 1 µg/l, definiert als Konzentration, die dem Mittelwert der Absorbanzwerte für den NSE-Kalibrator A plus 2 Standardabweichungen gemäß der folgenden Formel entspricht:

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

### Hook-Effekt

Für NSE-Konzentrationen bis 200.000 µg/l wurde kein Hook-Effekt festgestellt.

### Linearität

Patientenproben wurden mit normalem Serum verdünnt und analysiert. Die ermittelten Werte lagen im Bereich von 93 - 101 % der zu erwartenden Werte.

### Spezifität

Die verwendeten monoklonalen Antikörper sind spezifisch für die γ-Untereinheit der Enolase. Es wurden keine messbaren Kreuzreaktionen mit anderer Enolase beobachtet.

Die NCCLS-Richtlinie EP7-P (9) wurde befolgt, um mögliche Interferenzquellen zu erkennen. Die folgenden Substanzen und Konzentrationen wurden getestet, und es wurde keine Interferenz mit dem Test festgestellt.

---

	Konzentration ohne signifikante (± 10 %) Interferenz
Lipämie (Intralipid®)	10 mg/ml
Bilirubin, unkonjugiert	0,6 mg/ml

---

### GEWÄHRLEISTUNG

Die hier angegebenen Leistungsdaten wurden unter Anwendung des beschriebenen Assay-Verfahrens erzielt. Änderungen oder Modifikationen des Verfahrens, die nicht von Fujirebio Diagnostics empfohlen werden, können die Ergebnisse beeinflussen. In diesem Fall lehnt Fujirebio Diagnostics alle Gewährleistungen ausdrücklicher, stillschweigend miteinbegriffener oder gesetzlicher Art ab, einschließlich der Gewährleistung der handelsüblichen Qualität oder Eignung für einen bestimmten Zweck.

## LITERATURHINWEISE

1. Paus E. and Nustad K., (1989) Immunoradiometric Assay for  $\alpha\gamma$ - and  $\gamma\gamma$ -Enolase (Neuron-Specific Enolase), with Use of Monoclonal Antibodies and Magnetizable Polymer Particles. *Clin. Chem.* 35: 2034-2038.
2. Dahlén U., Karlsson B., Nilsson O. and Uhl W., (1995) Development of an Enzyme Immunoassay, NSE-Enzymun Test For Determination of Neuron-Specific Enolase. XXIII International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Montréal, Québec .
3. Paus E. and Risberg T., (1989) Establishment and Evaluation of a Radioimmunoassay for Neuron-Specific Enolase. *Tumor Biol.* 10: 23-30.
4. Cooper E.H., Pritchard J., Bailey C.C. and Ninane J., (1987) Serum neuron-specific enolase in children's cancer. *Br. J. Cancer* 56: 65–67.
5. Schneider, P. M. et al., (2002) Lung Cancer. In "Tumor markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications" Eds. Diamandis E. P. et al., AACCC Press, Washington pp 287-303.
6. Bonner J. A., Sloan JA., Rowland KM., Klee GG., Kugler JW., Mailliard JA., Wiesenfeld M., Krook JE., Maksymiuk AW., Shaw EG., Marks RS and Perez EA., (2000) Significance of Neuron-specific Enolase Levels before and during Therapy for Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 6: 597-601.
7. Pählman S., Esscher T., Bergvall P. and Odelstad L., (1984) Purification and characterization of human neuron-specific enolase: Radioimmunoassay development. *Tumor Biol.* 5: 127–139.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999)
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986)



---

CanAg® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB  
Elof Lindälvs gata 13  
SE-414 55 Göteborg  
Sweden  
Phone + 46 31-85 70 30  
Fax + 46 31-85 70 40  
info@fdab.com  
www.fdab.com