



ES

# EIA CanAg NSE

REF

420-10

IVD

CE

Instrucciones de uso. 2009-11

EN	EXPLANATION OF SYMBOLS
BG	ОБЯСНЕНИЕ НА СИМВОЛИТЕ
CS	VÝZNAM SYMBOLŮ
DA	SYMBOLFORKLARING
DE	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE
EL	ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΒΟΛΩΝ
ES	SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS
ET	SÜMBOLITE SELGITUS
FR	EXPLICATION DES SYMBOLES
HR	OBJAŠNJENJE SIMBOLA
HU	JELMAGYARÁZAT
IT	SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI
LT	SIMBOLIŲ PAAIŠKINIMAI
LV	SIMBOLU SKAIDROJUMS
NL	VERKLARING DER SYMBOLEN
NO	SYMBOLFORKLARING
PL	OBJAŚNIENIE SYMBOLI
PT	EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS
RO	SEMNIȚAȚIA SIMBOLURILOR
RU	ОБОЗНАЧЕНИЯ
SE	SYMBOLFÖRKLARING
SK	VÝZNAM SYMBOLOV
SL	RAZLAGA SIMBOLOV
SR	OBJAŠNJENJE SIMBOLA
TR	SEMBOLLERİN AÇIKLAMALARI



Use By/Годно до/Použitelné do/  
Holdbar til/Verwendbar bis/  
Ημερομηνία λήξης/Fecha  
de caducidad/Kölblük kuni/  
Utiliser jusque/Rok valjanosti/  
Felhasználható/Utilizzare entro/  
Sunautoti iki/Izlietot līdz/Houdbaar  
tot/Brukes innen/Użyć przed/  
Prazo de validade/Expirã la/  
Использовать до/Använd före/  
Použite né do/ Uporabno do/  
Upotrebljivo do/Son Kullanna Tarihi

LOT

Batch code/Номер на партида/  
Číslo šarže/Lotnummer/  
Chargenbezeichnung/Αριθμός  
Παρτίδας/Código de lote/Partii  
kood/Code du lot/Kod serije/  
Sarzsám/Codice del lotto/  
Partijos kodus/Partijas kods/Lot  
nummer/Partikode/Kod partii/  
Código do lote/Număr de lot/  
Номер лота/Lotnummer/Číslo  
šarže/Številka serije/Kod partije/  
Parti Kodu



Date of manufacture/Дата на производство/Datum výroby/  
Produktionsdato/Herstellungsdatum/  
Ημερομηνία παραγωγής/Fecha de fabricación/Valmistamise kuupäev/  
Date de fabrication/Datum proizvodnje/  
Gyártási idő/Data di produzione/  
Pagaminimo data/Ražošanas datums/  
Productiedatum/Fremstillingsdato/  
Data produkcji/Data de fabrico/Data fabricației/Дата производства/  
Tillverkningsdatum/Dátum výroby/Datum izdelave/Datum proizvodnje/Üretim tarihi



Temperature limitation/  
Температурни граници/  
Теплотни омеzeи/  
Temperaturbegränsning/  
Temperaturbegrenzung/  
Περιορισμοί θερμοκρασίας/  
Limites de temperatura/  
Temperatuuri piirang/  
Limite de température/  
Temperaturno ograničenje/  
Hőmérsékletre vonatkozó korlátozás/  
Limiti di temperatura/  
Temperatūriniai apribojimai/  
Temperatūras ierobežojums/  
Temperaturbepierking/  
Temperaturbegrensinger/  
Temperaturey graniczne/  
Limite de temperatura/  
Limite de temperatură/  
Температурный режим/  
Temperaturbegränsning/  
Teplotné obmedzenie  
Omejitve temperature/  
Temperaturno ograničenje/  
Sıcaklık sınırlaması/

## IVD

In Vitro Diagnostic Medical Device/  
Медицински уред за диагностика  
ин витро/Лéкаřský přístroj pro diagnostiku in vitro/Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik/In-vitro-Diagnostikum/  
Ιατροτεχνολογικό προϊόν για διάγνωση  
In Vitro/Dispositivo médico para diagnóstico in vitro/In vitro diagnostiline meditsiineasead/Dispositif médical de diagnostic in vitro/Diagnostički medicinski uređaj In Vitro/In vitro orvosdiagnosztikai eszköz/Dispositivo medico per test diagnostici in vitro/In Vitro Diagnostinė Medicinos Priemonė/  
Medicinska ierīce in vitro diagnostikai/  
In vitro-diagnostisch medisch instrument/  
In vitro diagnostisk medisinsk utstyr/  
Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/  
Dispositivo Médico de Diagnóstico In Vitro/Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro/Только для диагностики In Vitro/Endast för in vitro-diagnostik/  
Zdravotnička pomôcka na diagnostiku in vitro/In vitro diagnostični pripomoček/  
Diagnostički medicinski uređaj In Vitro/<96> testleri için yeterlilik içerir



Contains sufficient for <96> tests/Съдържа достатъчно количество за тестове <96>/Lze použít pro <96> testů/Ineholder tilstrækkeligt/Inhalt ausreichend für <96> Prüfungen/Περεχόμενο επαρκές για «96» εξετάσεις/Contenido suficiente para <96> ensayos/Kogusest piisab <96> testi läbiviimiseks/Contenu suffisant pour «96» tests/Sadržaj dovoljno za <96> testova/A doboz tartalma <96> vizsgálat elvégzéséhez elegendő/Contenuto sufficiente per «96» saggi/Turiny's skirtas atlikti <96> tyrimus/Saturs pietiekams <96> testiem/Inhoud voldoende voor «96» testen/til «96» test/ Tilstrækkelig innhold for <96> prøver/  
Wystarczy na wykonanie <96> testów/  
Conteúdo suficiente para «96» ensaios/  
Conținut suficient pentru 96 de teste/  
Содержит достаточные количества для «96» определений/Innehåller tillräckligt till «96» antal tester/Obsah postačuje na tento počet testov: <96>/Vsebina zadostuje za <96> testov/Sadržina dovoljna za <96> testova/<96> testleri için yeterlilik içerir

## REF

Catalogue number/Каталожен номер/  
Katalogové číslo/Katalognummer/  
Bestellnummer/Αριθμός καταλόγου/  
Número de catálogo/Katalogi number/  
Numéro de catalogue/Kataloški broj/  
Katalógusszám/Numero di catalogo/  
Katalogo numeris/Numurs katalogā/  
Catalogusnummer/Katalognummer/  
Numer katalogowy/Número do catálogo/  
Număr de catalog/Номер по каталогу/  
Produktnummer/Katalógové číslo/  
Kataloška številka/Kataloški broj/  
Katalog numarası



Consult Instructions for Use/  
Прочетете инструкцията за  
употреба/Konzultujte s návodem  
k použití/Se brugsanvisning/Siehe  
Gebrauchsanweisung/Συμβουλευτείτε  
της Οδηγίες σχετικά με τη χρήση/  
Consulte las instrucciones de uso/  
Vt kasutusjuhendit/Consulter le mode  
d'emploi/Pročítajte upute za uporabu/  
Olvassa el a használati utasítást/  
Consultare le istruzioni per l'uso/Dél  
naudojimo žiūrėkite instrukcijas/Izlasiet  
lietošanas instrukciju/Raadpleeg de  
instructies voor gebruik/Les instruksene  
for bruk/Sprawdzić w instrukcji użycia/  
Consulte as Instruções de Utilização/  
Consultați instrucțiunile de utilizare/  
Обратитесь к инструкции по  
применению/Se bruksanvisning/  
Prečítajte si návod na používanie/  
Pročítajte uputstvo za upotrebu/  
Kullanım Talimatlarını Bakınız

## CONT

Contents of kit/Съдържание на набора/  
Obsah sady/Kittets indhold/Inhalt des  
Kits/Περιεχόμενα του κιτ/Contenido  
del kit/Komplekt sisaldab/Contenu du  
kit/Sadržaj opreme/A készlet tartalma/  
Contenuto del kit/Rinkinio turinys/  
Komplekta saturs/Inhoud van de set/  
Settets innhold/Zawartość zestawu/  
Conteúdo do kit/Conținutul setului/  
Компоненты набора/Kit innehåll/  
Obsah súpravy/Vsebina kompleta/Sadržaj  
opreme/Kitin içindekiler



Biological risks/Биологическа  
опасност/Biológická rizika/Biologisk  
fare/Biologische Gefahren/Biológikoi  
kínðuvon/Riesgos biológicos/  
Biolooigilised ohud/Risques biologiques/  
Biolóškli rizici/Biológiai kockázatok/Rischi  
biologici/Biologinis pavojus/Biológiskais  
risks/Biologische risico's/Biologiske  
risikoer/Zagroženie biologiczne/Riscos  
biológicos/ Biologisk risk/Pericole  
biologice/Биологическая опасность/  
Biologický rizikové/Biológické riziká/  
Biolóškli rizici/Biyolojik riskler

## ORIG HUM

Human/C човешки производ/Lidské/  
Human/Human/δείγματα αναφοράς/  
Humano/Inimpãritolu/Humaine/Ljudskog  
porjekla/Humãn/Origine Umana/  
Žmogaus kilmės/Cilvēku izcelsmes/  
Human/Menneske/Ludzka/Humano/  
Origine umãnã/Человеческого  
происхождения/Human/Ludské/  
Humanega izvora/Ljudskog porekla/İnsan

## ORIG MOU

From mouse/C миши производ/Myši/  
Fra mus/der Maus/από ποντίκι/de raton/  
Hiirtelt/De souris/Mišijeg porjekla/  
Egérbdli/Murino/Pelès kilmės/No peles/  
Van muizen/Fra mus/Mysia/Do rato/De  
la șoareci/Мышиного происхождения/  
Från mus/Myšije/Mišjega izvora/Mišijeg  
porekla/Fareden

## ORIG BOV

Bovine/C говежди производ/  
Hovēži/Bovin/Rind/από βοοειδή/  
Bovino/Veistelt/Bovine/Rogate stoke/  
Szarvasmarha/Bovina/Jaučio/No  
liellopa/Bovien/Bovina/Wolowy/Bovino/  
Origine bovinã/крупного рогатого  
скота/Från ko/Hovädzie/Rogaveja  
izvora/Rogate krupne stoke/Bovin



Reconstitute with/Разтваряне с/  
Rozfeđe pomoci/Rekonstitutes med/  
Rekonstituieren mit/Ανασύσταση με/  
Reconstituir con/Lahjendamine/  
Reconstituer avec/Rekonstituiraite s/  
Feloldáshoz/Ricostituire con/LT/Atškaidīt  
ar/Reconstituie me/Rekonstituerees  
med/Odtworzyć za pomocą/Reconstituir  
com/A se reconstitui cu/Растворить в/  
Rekonstituera med/Rozriedte pomocou/  
Rekonstituiraite z/s/ Ponadto formiranje  
sa/Yeniden oluřturulur



Manufacturer/Производитель/Výrobce/  
Producent/Hersteller/Κτασκευαστής/  
Fabricante/Tootja/Fabricant/Proizvođač/  
Gyártó/Fabbricante/Gamintojas/  
Ražotājs/Fabrikant/Produsent/  
Producent/Fabricante/Producător/  
Производитель/Тилverkare/ Výrobca/  
Izdevalavec/Proizvođač/Üretici

# CanAg NSE EIA

Instrucciones de uso

Kit de ensayo inmunométrico enzimático  
Para 96 determinaciones

## USO PREVISTO

El kit EIA CanAg NSE está destinado a la determinación cuantitativa de NSE en suero humano.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

La enzima glucolítica 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  $\gamma\gamma$ ) compuestas por tres subunidades distintas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La unidad  $\gamma$  se encuentra en una enzima homóloga  $\gamma\gamma$  o en una isoenzima heteróloga  $\alpha\gamma$ , y se conoce como enolasa neuronal específica (NSE, neuron-specific enolase). Los anticuerpos monoclonales utilizados en el EIA CanAg NSE se unen a la subunidad  $\gamma$  de la enzima y, por tanto, detectan tanto la forma  $\gamma\gamma$  como la forma  $\alpha\gamma$  (1, 2). Los valores de NSE son bajos en sujetos sanos y en pacientes con enfermedades benignas. Sin embargo, es frecuente encontrar niveles elevados en pacientes con neoplasias malignas de diferenciación neuroendocrina, especialmente, carcinoma pulmonar microcítico (CPMC) (3) y neuroblastoma (4). La determinación cuantitativa de NSE en suero puede ser valiosa en el tratamiento de los pacientes con diagnóstico de sospecha o confirmado de CPMC o neuroblastoma, para contribuir al diagnóstico diferencial y para controlar el efecto del tratamiento (5, 6).

## PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El EIA CanAg NSE es un inmunoensayo en fase sólida no competitivo basado en dos anticuerpos monoclonales (derivados de ratones) dirigidos contra dos determinantes antigénicos diferentes de la molécula de NSE. Los anticuerpos monoclonales (MAb) utilizados se unen a la subunidad  $\gamma$  de la enzima y, por tanto, detectan tanto la forma  $\gamma\gamma$  como la forma  $\alpha\gamma$ . Los calibradores y las muestras del paciente se incuban junto con el MAb anti-NSE biotinilado E21 y el MAb de ratón anti-NSE con peroxidasa de rábano (HRP) E17, en microtiras revestidas con estreptavidina. Después del lavado, se añade reactivo tamponado sustrato/cromógeno (peróxido de hidrógeno y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a cada pocillo y se deja que se produzca la reacción enzimática. Si hay antígeno, durante la reacción enzimática se desarrollará un color azul. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de NSE presente en las muestras.

Dicha intensidad se determina en un espectrofotómetro de microplacas a 620 nm (o bien a 405 nm tras la adición de solución de parada).

Se construyen curvas de calibración para cada ensayo representando el valor de absorbancia frente a la concentración de cada calibrador. Finalmente, se leen las concentraciones de NSE de las muestras de los pacientes a partir de la curva de calibración.

## **REACTIVOS**

- Cada kit EIA CanAg NSE contiene reactivos para 96 determinaciones.
- La fecha de caducidad del kit viene indicada en la etiqueta de la parte externa de la caja.
- No use el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes de kits.
- Conserve el kit a una temperatura de 2 °C a 8 °C. No lo congele.
- La estabilidad de los reactivos abiertos se resume en la tabla siguiente, siempre que no estén contaminados, que se conserven en los recipientes originales nuevamente cerrados y que se manipulen como se indica. Vuelva a dejarlos a una temperatura de 2 °C a 8 °C inmediatamente después de su uso.

Componente	Cantidad	Conservación y estabilidad después de la primera apertura
------------	----------	---

<b>MICROPLA</b>
-----------------

<b>Microplaca</b>	1 placa	2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la placa
-------------------	---------	---

12 x 8 pocillos separables recubiertos con estreptavidina. Después de abrir el envase, devuelva inmediatamente las tiras no utilizadas a la bolsa de aluminio con desecante y vuelva a cerrarla cuidadosamente para mantenerlas secas.

<b>Calibradores de NSE</b>	5 viales, liofilizados	4 semanas a 2-8 °C 3 meses a -20 °C
----------------------------	------------------------	--

<b>CAL</b>	<b>NSE</b>	<b>A</b>	1 x 0,75 mL
------------	------------	----------	-------------

<b>CAL</b>	<b>NSE</b>	<b>B</b>	1 x 0,75 mL
------------	------------	----------	-------------

<b>CAL</b>	<b>NSE</b>	<b>C</b>	1 x 0,75 mL
------------	------------	----------	-------------

<b>CAL</b>	<b>NSE</b>	<b>D</b>	1 x 0,75 mL
------------	------------	----------	-------------

<b>CAL</b>	<b>NSE</b>	<b>E</b>	1 x 0,75 mL
------------	------------	----------	-------------

Los calibradores liofilizados contienen NSE humana en una matriz proteica con un 0,01% de conservante sin azida. Para reconstituir con 0,75 mL de agua destilada o desionizada antes de su uso.

**NOTA:** la concentración exacta de NSE es específica del lote y se indica en la etiqueta de cada vial.

<b>BIOTIN</b>	<b>Anti-NSE</b>
---------------	-----------------

Anti-NSE con biotina	1 x 15 mL	2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial
----------------------	-----------	--

Anticuerpo monoclonal anti-NSE de ratón marcado con biotina, aproximadamente 2 µg/mL. Contiene solución salina tamponada con fosfato (pH 7,1), albúmina sérica bovina, agentes bloqueantes, un colorante azul inerte y metilisotiazolona (MIT) al 0,01 % como conservante. Para mezclar con marcador, anti-NSE con HRP, antes de su uso.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Conservación y estabilidad después de la primera apertura</b>
-------------------	-----------------	--

<b>CONJ</b>	<b>Anti-NSE</b>
-------------	-----------------

Marcador, Anti-NSE con HRP    1 x 0,75 mL    2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial

Solución de reserva de anticuerpo monoclonal anti-NSE de ratón con HRP, aproximadamente 40 µg/mL. Para mezclar con anti-NSE con biotina antes de su uso. Contiene metilisotiazolona (MIT) al 0,02%, bromonitrodioxano al 0,02% y 20 ppm de Proclin™ 300 como conservantes.

<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>
-------------	------------

Substrato TMB de HRP    1 x 12 mL    2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial

Listo para su uso. Contiene peróxido de hidrógeno tamponado y 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB).

<b>STOP</b>
-------------

Solución de parada    1 x 15 mL    2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el vial

Listo para su uso. Contiene ácido clorhídrico 0,12 M.

<b>WASHBUF</b>	<b>25X</b>
----------------	------------

Concentrado de lavado    1 x 50 mL    2–8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el frasco

Para diluir con agua 25 veces antes de usar. Solución salina tamponada con Tris-HCl y estabilizada con Tween 20. Contiene Germall II como conservante.

## **Indicaciones de inestabilidad**

La solución de sustrato TMB de HRP debe ser incolora o ligeramente azulada. Un color azul indica que el reactivo se ha contaminado y debe desecharse.

## **ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

### **Para uso diagnóstico in vitro**

- Sólo para uso profesional
- Consulte la publicación número 88-8395 (CDC) del U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., EEUU) sobre procedimientos de seguridad en el laboratorio, o la correspondiente normativa local o nacional.
- Manipule todas las muestras de pacientes como potencialmente infecciosas.
- Siga las directrices locales para la eliminación de todos los materiales de desecho.

### **Advertencia**

Todas las unidades de donación utilizadas en la preparación del reactivo original humano han sido analizadas y se ha comprobado que no reaccionan con los anticuerpos anti-VIH-1/2, el anticuerpo anti-VHC y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). Puesto que ningún método puede descartar completamente la presencia de enfermedades transmitidas por la sangre, la manipulación y la eliminación de los reactivos originales humanos de este producto deben realizarse como si fueran potencialmente infecciosos.

## **RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

El kit EIA CanAg NSE está diseñado para utilizarse con suero. Recoja la sangre mediante venopunción y separe el suero según los procedimientos habituales. Se procederá a separar el suero del coágulo antes de que transcurran 60 minutos desde la recogida, para evitar la fuga de la NSE de las células sanguíneas. No utilice muestras hemolizadas. No se recomienda el plasma, ya que las plaquetas pueden liberar cantidades significativas de NSE. Las muestras se pueden conservar entre 2 °C y 8 °C durante 24 horas. Para períodos más largos, guarde las muestras a -70 °C o menos. Las muestras no se guardarán en un congelador con sistema antiescarcha, y no se descongelarán y re congelarán antes del análisis. Lleve las muestras congeladas a temperatura ambiente y mézclelas **COMPLETAMENTE** invirtiéndolas con cuidado varias veces antes del análisis. Las muestras que contienen partículas grandes deben centrifugarse a 10.000 x g durante 10 minutos antes del uso para eliminar cualquier material particulado que pueda haberse formado en el proceso de descongelación. Analice las muestras descongeladas en el plazo de 1 hora.

## PROCEDIMIENTO

### Materiales necesarios pero no suministrados con el kit

#### 1. Agitador de microplacas

La agitación debe ser entre moderada y vigorosa. Agitación longitudinal de aproximadamente 200 golpes/min; 700-900 oscilaciones/min.

#### 2. Lavador de microplacas

Lavador automático de placas, capaz de realizar 1 y 6 ciclos de lavado, o dispositivo semimanual de lavado de microplacas conectado a bomba de vacío o vacío con chorro de agua y una trampa de líquidos para retener el líquido aspirado.

Se recomienda el lavador manual de tiras Nunc Immuno-8, si no se usa un lavador automático de microplacas.

#### 3. Espectrofotómetro de microplacas

Con una longitud de onda de 620 nm y/o 405 nm y un rango de absorbancia de 0 a 3,0.

#### 4. Pipetas de precisión

Con puntas de plástico desechables para administrar volúmenes en microlitros. Una pipeta de 8 canales o una pipeta dispensadora con puntas de plástico desechables para la administración de 100  $\mu$ L son útiles, pero no esenciales. Pipetas para administrar volúmenes en mililitros.

#### 5. Agua destilada o desionizada

Para la reconstitución de los calibradores de NSE y para la preparación de la solución de lavado.

### Notas del procedimiento

1. Es necesaria la total comprensión de las instrucciones que figuran en este prospecto para garantizar un uso adecuado del kit EIA CanAg NSE. Los reactivos suministrados con el kit están pensados para su uso como una unidad integral. No mezcle reactivos idénticos de kits con números de lote diferentes. No use los reactivos del kit después de la fecha de caducidad impresa en la parte exterior de la caja.
2. Se debe dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) antes de su uso. El ensayo sólo debe realizarse a temperaturas comprendidas entre 20 °C y 25 °C para obtener resultados precisos. Las muestras deben mezclarse suave, pero completamente, tras la descongelación.
3. Antes de comenzar a pipetear los calibradores y las muestras de los pacientes, es aconsejable marcar las tiras para poder identificar claramente las muestras durante y después del ensayo.

4. El requisito de un lavado eficaz y profundo para la separación del antígeno unido y no unido y los reactivos de los complejos anticuerpo-antígeno unidos a la fase sólida es uno de los pasos más importantes en un EIA. A fin de garantizar un lavado eficaz, compruebe que todos los pocillos estén totalmente llenos con solución de lavado hasta el borde superior durante cada ciclo de lavado, que la solución de lavado se administre con una velocidad de dispensación adecuada, que la aspiración de los pocillos entre y después de los ciclos de lavado sea completa y que los pocillos estén vacíos.
  - Lavador automático de tiras: Siga las instrucciones del fabricante para el mantenimiento y realice el número necesario de ciclos de lavado antes y después de cada paso de incubación. Es muy recomendable utilizar el modo de procesamiento *strip* (tira) y el modo de lavado *overflow* (desbordamiento) con un volumen de dispensación de 800  $\mu$ L. El dispositivo de aspiración/lavado no debe dejarse de pie con la solución de lavado durante períodos prolongados, ya las agujas podrían obstruirse, lo que provocaría una mala dispensación y aspiración de líquidos.
5. La solución de sustrato TMB de HRP es muy sensible a la contaminación. Para una estabilidad óptima de la solución de sustrato TMB de HRP, vierta la cantidad necesaria del vial en un reservorio limpiado cuidadosamente o, mejor, a en bandeja de plástico desechable, para evitar la contaminación del reactivo. Utilice siempre puntas de pipeta de plástico desechables limpias (o puntas de pipeta dispensadora).
6. Utilice siempre puntas de pipeta de plástico desechables limpias, así como una técnica de pipeteado adecuada, al manipular muestras y reactivos. Evite la contaminación sujetando la punta de la pipeta ligeramente por encima de la parte superior del pocillo y evitando tocar la tira de plástico o la superficie del líquido. Usar una técnica de pipeteado adecuada es especialmente importante al manipular la solución de sustrato TMB de HRP.

---

**Preparación de los reactivos****Estabilidad del reactivo preparado**

---

**Calibradores de NSE**

4 semanas a 2-8 °C

3 meses a -20 °C

Añada exactamente 0,75 mL de agua destilada a cada vial y mezcle suavemente. Deje reposar al menos 15 minutos para que se reconstituya. **NOTA:** la concentración de los calibradores se indica en las etiquetas y debe usarse para el cálculo de los resultados.

---

**Solución de lavado**

2 semanas a 2–25 °C

en un recipiente cerrado

Vierta los 50 mL del concentrado de lavado en un recipiente limpio y diluya 25 veces añadiendo 1.200 mL de agua destilada o desionizada para conseguir una solución de lavado tamponada.

---

**Solución de anticuerpo**

3 semanas a 2-8 °C

Prepare la cantidad necesaria de solución de anticuerpo mezclando 50 µL de marcador, anti-NSE con HRP, con 1 mL de anticuerpo anti-NSE con biotina por tira (véase la tabla siguiente).

---

Número de tiras	Marcador, anti-NSE con HRP (µL)	Anti-NSE con biotina (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

Asegúrese de usar un frasco limpio de plástico o vidrio para preparar la solución de anticuerpo.

**Alternativa:** vierta el contenido del marcador, anti-NSE con HRP, en el vial de anti-NSE con biotina y mezcle suavemente. Compruebe que todo el marcador se transfiera al vial de anti-NSE con biotina.

**NOTA:** la solución de anticuerpo es estable durante 3 semanas a temperatura de 2 °C a 8 °C. No prepare más solución de anticuerpos que la que se usará en este período y compruebe que se conserva adecuadamente.

# Hoja de protocolo

**EIA CanAg NSE** REF **420-10**

Prepare los componentes directamente antes de utilizarlos. Use las condiciones de agitación indicadas en las instrucciones.

<b>Paso</b>	<b>Frasco/Placa</b>	<b>Procedimiento</b>																
1. Prepare los calibradores de NSE	<table border="1"><tr><td><b>CAL</b></td><td><b>NSE</b></td></tr><tr><td colspan="2">A, B, C, D, E</td></tr></table>	<b>CAL</b>	<b>NSE</b>	A, B, C, D, E		Añada exactamente 0,75 mL de agua destilada a cada vial y mezcle suavemente. Deje reposar durante al menos 15 minutos. <b>NOTA:</b> la concentración exacta de cada calibrador está indicada en la etiqueta. Este valor de los calibradores se empleará para los cálculos.												
	<b>CAL</b>	<b>NSE</b>																
A, B, C, D, E																		
2. Prepare la solución de lavado	<table border="1"><tr><td><b>WASHBUF</b></td><td><b>25X</b></td></tr></table>	<b>WASHBUF</b>	<b>25X</b>															
<b>WASHBUF</b>	<b>25X</b>																	
3. Prepare la solución de anticuerpo	<table border="1"><tr><td><b>CONJ</b></td><td><b>Anti-NSE</b></td></tr></table>	<b>CONJ</b>	<b>Anti-NSE</b>	Diluya 50 mL de concentrado de lavado con 1.200 mL de agua destilada o desionizada.  Mezcle 50 µL de marcador, anti-NSE con HRP, con 1 mL de anti-NSE con biotina por tira:														
	<b>CONJ</b>	<b>Anti-NSE</b>																
	<table border="1"><tr><td><b>BIOTIN</b></td><td><b>Anti-NSE</b></td></tr></table>	<b>BIOTIN</b>	<b>Anti-NSE</b>															
<b>BIOTIN</b>	<b>Anti-NSE</b>																	
<table border="1"><thead><tr><th><b>Número de tiras</b></th><th><b>Anti-NSE con HRP (µL)</b></th><th><b>Anti-NSE con biotina (mL)</b></th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr><tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr><tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr><tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr><tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr></tbody></table>	<b>Número de tiras</b>	<b>Anti-NSE con HRP (µL)</b>	<b>Anti-NSE con biotina (mL)</b>	1	50	1	2	100	2	3	150	3	4	200	4	5	250	5
<b>Número de tiras</b>	<b>Anti-NSE con HRP (µL)</b>	<b>Anti-NSE con biotina (mL)</b>																
1	50	1																
2	100	2																
3	150	3																
4	200	4																
5	250	5																

5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

4.	Lave	<b>MICROPLA</b>	Lave cada pocillo una vez con la solución de lavado
5.	Añada los callbradores y muestras	<b>CAL</b> <b>NSE</b> A, B, C, D, E	25 µL en cada pocillo
6.	Añada la solución de anticuerpo	<b>SOLUCIÓN DE ANTICUERPO</b>	100 µL en cada pocillo
7.	Incube	<b>MICROPLA</b>	Agitación durante 1 hora a temperatura ambiente
8.	Lave	<b>MICROPLA</b>	Lave cada pocillo seis veces con la solución de lavado
9.	Añada sustrato TMB de HRP	<b>SUBS</b> <b>TMB</b>	100 µL en cada pocillo
10.	Incube	<b>MICROPLA</b>	Agitación durante 30 min a temperatura ambiente
11.	Lea la absorbancia	<b>MICROPLA</b>	620 nm
11 (alternativo).	Añada la solución de parada	<b>STOP</b>	100 µL en cada pocillo
12 (alternativo).	Incube	<b>MICROPLA</b>	Agitación durante 1 min a temperatura ambiente
13 (alternativo).	Lea la absorbancia	<b>MICROPLA</b>	Lea el resultado a 405 nm antes de 15 min.

## Procedimiento del ensayo

Realice cada determinación por duplicado para los calibradores y las muestras de los pacientes. Debe elaborarse una curva de calibración con cada ensayo. Todos los reactivos y muestras deben llevarse a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) antes de su uso.

1. Comience por preparar los calibradores de NSE, la solución de lavado y la solución de anticuerpo.  
Es importante usar recipientes limpios. Siga las instrucciones cuidadosamente.
2. Transfiera el número necesario de tiras de microplacas a un soporte de tiras. (Devuelva inmediatamente las tiras no utilizadas a la bolsa de aluminio con desecante y vuelva a cerrarla cuidadosamente.) Lave cada tira una vez con la solución de lavado. No lave más tiras de las que puedan manejarse en 30 minutos.
3. Pipetee 25 µL de los calibradores de NSE (CAL A, B, C, D, E) y las muestras de pacientes (desconocidos o "desc.") en los pocillos de las tiras, de acuerdo con el esquema siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7 etc.
A	Cal A	Cal E	4° Desc.				
B	Cal A	Cal E	etc.				
C	Cal B	1° Desc.					
D	Cal B	1° Desc.					
E	Cal C	2° Desc.					
F	Cal C	2° Desc.					
G	Cal D	3° desc.					
H	Cal D	3° Desc.					

4. Añada 100 µL de solución de anticuerpo a cada pocillo, usando una pipeta de precisión de 100 µL (o una pipeta de precisión de 100 µL de 8 canales). Evite la contaminación sujetando la punta de la pipeta ligeramente por encima de la parte superior del pocillo y evitando tocar la tira de plástico o la superficie del líquido.
5. Incube la placa durante 1 hora ( $\pm$  10 min.) a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) agitándola constantemente en un agitador de microplacas.
6. Tras la incubación, aspire y lave cada tira 6 veces.

7. Añada 100 µL de sustrato TMB de HRP a cada pocillo usando el mismo procedimiento de pipeteado que en el punto 4. La solución de sustrato TMB de HRP debe añadirse a los pocillos con la mayor rapidez posible y el tiempo entre la adición al primer pocillo y al último no debe superar los 5 minutos.
8. Incube durante 30 min ( $\pm$  5 min) a temperatura ambiente, agitando constantemente. Evite la exposición a luz solar directa.
9. Lea inmediatamente la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

### **Opción**

Si el laboratorio no tiene acceso a un lector de microplacas capaz de leer a 620 nm, la absorbancia puede determinarse tal como se indica en el punto 10:

10. Añada 100 µL de solución de parada, mezcle y lea la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de microplacas dentro de los 15 minutos siguientes a la adición de la solución de parada.

### **Rango de medición**

El kit EIA CanAg NSE mide concentraciones entre 1 y aproximadamente 150 µg/L. Si se esperan concentraciones de NSE por encima del rango de medición, se recomienda diluir las muestras con suero humano normal antes del análisis.

**NOTA:** el suero empleado para la dilución debe medirse también para determinar la concentración de NSE endógena (véase "Cálculo de los resultados").

### **Control de calidad**

Se recomiendan los niveles 1 y 2 (disponibles por separado, REF 107-20) del CanChek Tumor Marker Control Sera, para la validación de la serie de ensayos. Si se obtienen valores fuera del rango especificado, deberán revisarse completamente los reactivos y el funcionamiento del lector y repetirse el análisis.

### **Materiales de referencia**

Como no se dispone de material de referencia común para el antígeno NSE, los valores del calibrador de EIA CanAg NSE se asignan de acuerdo con una serie de estándares de referencia internos.

### **CÁLCULO DE LOS RESULTADOS**

Si utiliza un espectrofotómetro de microplacas con programa de cálculo incorporado, consulte el manual del espectrofotómetro y cree un programa usando la concentración indicada en la etiqueta de cada uno de los calibradores de NSE.

Para el cálculo automático de los resultados de NSE, se recomienda usar cualquiera de los métodos siguientes:

- Método de ajuste de la curva spline cúbica. El calibrador A debe estar incluido en la curva con el valor 0 µg/L.
- Método de ajuste de la curva spline suavizada. El calibrador A debe usarse como blanco de la placa.
- Interpolación con evaluación punto a punto. El calibrador A debe estar incluido en la curva con el valor 0 µg/L.
- Método de ajuste de la curva cuadrática. El calibrador A debe estar incluido en la curva con el valor 0 µg/L.

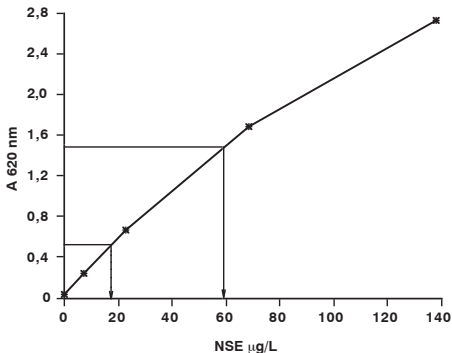
**NOTA:** no deben usarse métodos de evaluación por regresión lineal ni paramétricos de grado 4.

Para la evaluación manual, se construye una curva de calibración representando los valores de absorbancia (A) para cada calibrador de NSE frente a la concentración de NSE correspondiente (en µg/L) (véase la figura más abajo). Las concentraciones de NSE desconocidas pueden leerse después a partir de la curva de calibración usando el valor de absorbancia medio de cada muestra de paciente. Si las muestras en un análisis inicial indican niveles de NSE superiores a la concentración del calibrador E, es necesario diluir la muestra a 1/10 con suero humano normal para obtener resultados exactos. El resultado se calculara de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Dilución a 1/10:  $10 \times ([NSE]_{\text{Muestra diluida}} - (0,9 \times [NSE]_{\text{Suero humano normal}}))$

### Ejemplo de resultados

Muestra	Valores decalibrador	Valor de abs. media (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	
Muestra 1		0,518	17,5
Muestra 2		1,474	57,8



*Ejemplo, no use esta curva para determinar los resultados del ensayo.*

*La concentración exacta de NSE se indica en la etiqueta de cada vial de calibrador.*

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El nivel de NSE no puede usarse como prueba absoluta de la presencia o ausencia de enfermedad maligna, y no debe utilizarse la prueba de NSE en el cribado del cáncer. Los resultados de la prueba sólo deben interpretarse junto con los resultados de otras investigaciones y procedimientos en el diagnóstico de las enfermedades, y la prueba NSE no debe sustituir a ninguna exploración clínica establecida.

Pueden observarse valores elevados de NSE, no debidos a tumores, en pacientes sometidos a diálisis y en pacientes con leucemia.

El suero no contendrá hemólisis visible (la absorbancia a 500 nm para muestras no turbias no superará el 0,3) puesto que los eritrocitos contienen cantidades significativas de NSE (7). La conservación prolongada de sangre entera puede provocar la liberación de NSE de las células sanguíneas.

Los anticuerpos anti-reactivo (anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) o anticuerpos heterófilos) en la muestra del paciente pueden interferir ocasionalmente con el ensayo, aunque se incluyan agentes bloqueantes específicos en el tampón.

## VALORES ESPERADOS

Se espera que los individuos sanos presenten valores de NSE inferiores a 13 µg/L. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo normal para tener en cuenta factores ambientales locales como la dieta, el clima, las condiciones de vida, la selección de pacientes, etc.

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### Precisión

La precisión total se determinó según la directriz EP5-A (8) del NCCLS utilizando cuatro niveles de suero humano agrupado y congelado que contenía NSE añadida. Cada muestra se pipeteó aleatoriamente por duplicado y se analizó dos veces cada día durante 20 días. Los análisis se realizaron durante un período de 40 meses, por  $\geq$  tres técnicos distintos y utilizando 20 lotes diferentes de EIA CanAg NSE.

Muestra	Duplicados	Media $\mu\text{g/L}$	Intraensayo DE ( $\mu\text{g/L}$ )	Intraensayo CV (%)	Interdía DE ( $\mu\text{g/L}$ )	Interdía 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

### Límite de detección

El límite de detección del kit EIA CanAg NSE es  $< 1 \mu\text{g/L}$ , definido como la concentración correspondiente a la media de los valores de absorbancia del calibrador A de NSE más 2 desviaciones estándar, según la fórmula:

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

### Efecto de gancho

No se ha observado efecto de gancho con muestras hasta de 200.000  $\mu\text{g/L}$ .

### Linealidad

Se diluyeron de forma seriada las muestras de los pacientes con suero humano normal y se analizaron. Los valores obtenidos estuvieron dentro del 93-101% de los valores esperados.

## Especificidad

Los anticuerpos monoclonales utilizados son específicos para la subunidad  $\gamma$  de la enolasa. No se han observado reactividades cruzadas medibles con otras enolasas. Se siguió la directriz EP7-P (9) del NCCLS para determinar posibles fuentes de interferencia. Se estudiaron las siguientes sustancias y concentraciones y se observó que no interfieren con la prueba.

	<b>Concentración sin interferencia significativa (<math>\pm</math> 10%)</b>
Lipemia (Intralipid®)	10 mg/mL
Bilirrubina no conjugada	0,6 mg/mL

## **GARANTÍA**

Los datos de rendimiento aquí presentados se obtuvieron usando el procedimiento de ensayo indicado. Cualquier cambio o modificación del procedimiento no recomendado por Fujirebio Diagnostics puede afectar a los resultados, en cuyo caso Fujirebio Diagnostics rechaza todas las garantías expresas, implícitas u obligatorias, incluida la garantía implícita de comerciabilidad e idoneidad para el uso.

## BIBLIOGRAFÍA

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. Cooper E.H., (1994) Neuron-specific enolase. *The International Journal of Biological Markers* 9(4):205-10.
4. Cooper E.H., Pritchard J., Bailey C.C. and Ninane J., (1987) Serum 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®** es una marca registrada de Fujirebio Diagnostics AB

**Fujirebio Diagnostics AB**

**Elof Lindälvs gata 13**

**SE-414 55 Gotemburgo**

**Suecia**

**Teléfono + 46 31 85 70 30**

**Fax + 46 31 85 70 40**

**info@fdab.com**

**www.fdab.com**

