

Інструкція із застосування
Нейронспецифічна енолаза людини (ЛНСЕ)



Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com

1. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Імуноферментний колориметричний метод кількісного визначення концентрації hNSE у сироватці крові людини.

Набір NSE ІФА призначений лише для лабораторного використання.

1.1 Клінічне значення

Нейрон-специфічна енолаза (2-фосфо-D-гліцератгідролаза) є ізоферментом, який належить до родини енолаз (гомо- та гетеродимер, що складається з α , β та γ субодиниці), який відрізняється від них наявністю специфічного $\gamma\gamma$ гетеродимера.

Клінічну корисність пухлинного маркера, подібного до hNSE, порівнюють із недрібноклітинним раком легенів (NSCLC), нейробластомою, медулярною карциномою щитовидної залози, пухлиною острівцевих клітин підшлункової залози та непухлинним станом нейрональних захворювань і церебральною травмою. Аналіз NSE ІФА не можна використовувати як скринінговий аналіз на нейроендокринні пухлини, але його можна використовувати для відстеження рівнів у встановленому діагнозі.

2. ПРИНЦИП

Аналіз NSE ІФА заснований на одночасному зв'язуванні людської нейронспецифічної енолази двома моноклональними антитілами, одне з яких іммобілізоване на мікропланшетах, а інше кон'юговано з пероксидазою хрому (HRP). Після інкубації виконується розділення зв'язаного/вільного шляхом простого промивання твердої фази, потім додається розчин ТМБ-субстрату (ТМБ). Після закінчення часу, необхідного для максимального прояву кольору, реакцію ферменту припиняють і визначають поглинання.

Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації hNSE у зразку.

Концентрація hNSE у зразку розраховується на основі стандартної кривої.

3. РЕАКТИВИ, МАТЕРІАЛИ ТА ПРИЛАДИ

3.1 Реагенти та матеріали, що входять до набору

Стандарти та контролі - ліофілізовані*

Кат.№	символ	Стандарт	концентрація **	Об'єм/ флакон
ТМ Е-4701		Стандарт А	0 нг/мл	2 x 0,75 мл
ТМ Е-4702	STANDARD A	Стандарт Б	4 нг/мл	2 x 0,75 мл
ТМ Е-4703	STANDARD B	Стандарт С	20 нг/мл	2 x 0,75 мл
ТМ Е-4704	STANDARD C	Стандарт D	50 нг/мл	2 x 0,75 мл
ТМ Е-4705	STANDARD D	Стандарт E	100 нг/мл	2 x 0,75 мл
ТМ Е-4751	STANDARD E	Контроль 1	Правильна концентрація є вказано на флаконі стандарту на етикетці та у звіті про контроль якості	2 x 0,75 мл
ТМ Е-4752	CONTROL 1	Контроль 2		2 x 0,75 мл
	CONTROL 2			

* уважно прочитайте пункт 6.1

**приблизна концентрація: правильна концентрація для обчислення кривої залежить від партії та вказана на етикетках стандартних флаконів і у звіті про контроль якості.

ТМ Е-4713

Інкубаційний буфер

Зміст: INC-BUFF
Фосфатний буфер (50 мМ), рН 7,4; BSA (1 г/л)
обсяг: 1 x 50 мл

ТМ Е-4740

Кон'югат

Зміст: CONJUGATE-CONC
Моноклональне антитіло проти hNSE, кон'юговане з пероксидазою хрому (HRP)
обсяг: 1 x 1 мл

ТМ Е-4731

Мікропланшет

Зміст: 96 1 ламкий мікропланшет, моноклональне антитіло проти hNSE, адсорбоване на мікропланшеті

MS Е-0055

Субстрат ТМБ

Зміст: SUBSTRATE
Х₂О₂-ТМБ 0,26 г/л (уникати контакту зі шкірою)
обсяг: 1 x 15 мл

MS E-0080**STOP-SOLN****Стоп розчин**

Зміст: Сірчана кислота 0,15 моль/л (уникати контакту зі шкірою)
 обсяг: 1 x 15 мл

Ідентифікація
 небезпеки:



H290 Може викликати корозію металів.
 H314 Викликає серйозні опіки шкіри та пошкодження очей.

SA E-0030**WASH-CONC****Промивний розчин - 50x концентрований**

Зміст: NaCl (45 г/л); Твін 20 (55 г/л)
 обсяг: 1 x 20 мл

3.2 Необхідні реагенти, які не постачаються

Дистильована вода.

3.3 Допоміжні матеріали та прилади

Автоматичний дозатор.
 Зчитувач мікропланшетів (450 нм, 620 - 630 нм)

Примітка

Стандарти та контролю містять hNSE у розчині протеїнової стабілізуючої матриці.
 Зберігайте всі реагенти при температурі від 2 °C до 8 °C у темряві.
 Відкривайте пакет з реагентом 4 (мікропланшет з покриттям), лише коли він досяг кімнатної температури, і закривайте його одразу після використання; після відкриття планшет стабільний до закінчення терміну придатності.

4. ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Цей набір призначений для використання in vitro лише професійними особами. Не для внутрішнього чи зовнішнього використання у людей чи тварин.
- Під час роботи з наданими реагентами використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту.
- Дотримуйтеся належної лабораторної практики (НЛП) щодо поводження з продуктами крові.
- Деякі реагенти містять невелику кількість Proclin 300 як консервант. Уникайте контакту зі шкірою або слизовими.
- Субстрат ТМБ містить подразник, який може бути шкідливим при вдиханні, проковтуванні або поглинанні через шкіру. Щоб запобігти травмам, уникайте вдихання, проковтування або контакту зі шкірою та очима.
 Стоп Розчин складається з розбавленого розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота є отруйною та корозійною, а також може бути токсичною при попаданні всередину. Щоб запобігти хімічним опікам, уникайте контакту зі шкірою та очима.
- Уникайте впливу реагенту ТМБ/H₂O₂ спрямованого сонячного світла, металів або окислювачів. Не заморожуйте розчин.
- Цей метод дозволяє визначати hNSE в діапазоні стандарту А – стандарту Е. Значення стандартів залежать від партії.

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

- Будь ласка, суворо дотримуйтесь послідовності етапів дозування, наведених у цьому протоколі. Наведені тут дані про ефективність отримано з використанням конкретних реагентів, перелічених у цій інструкції з використання.
- Усі реагенти слід зберігати в холодильнику при температурі 2 °C - 8 °C в оригінальній упаковці. Будь-які винятки чітко вказані. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності за умови зберігання та поводження відповідно до вказівок.
- Дайте всім компонентам набору та зразкам досягти кімнатної температури (22 °C - 28 °C) і добре перемішайте перед використанням.
- Не замінюйте компоненти набору з різних партій. Необхідно дотримуватися терміну придатності, зазначеного на етикетках коробок і флаконів. Не використовуйте компоненти набору після закінчення терміну придатності.
- Якщо ви використовуєте автоматизоване обладнання, користувач несе відповідальність за те, щоб набір пройшов відповідні випробування.
- Неповне або неточне видалення рідини з лунок може вплинути на точність аналізу та/або збільшити фон. Для підвищення продуктивності набору на автоматичних системах рекомендується збільшити кількість прань.
- Важливо, щоб час реакції в кожній лунці підтримувався постійним для відтворюваних результатів. Піпетування зразків не повинно тривати більше десяти хвилин, щоб уникнути дрейфу аналізу. Якщо потрібно більше 10 хвилин, дотримуйтеся того ж порядку дозування. Якщо використовується більше одного планшета, рекомендується повторити криву доза-відповідь у кожному планшеті
- Додавання розчину субстрату ТМБ ініціює кінетичну реакцію, яка припиняється додаванням стоп-розчину. Таким чином, субстрат ТМБ і стоп-розчин слід додавати в тій же послідовності, щоб усунути будь-які відхилення часу під час реакції.

- Дотримуйтеся вказівок щодо виконання контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу контролів та/або об'єднаних сироваток.
- Для відновлення та дозування реагентів потрібна максимальна точність.
- Зразки з мікробіологічним забрудненням, високою ліпемією або гемолізом не повинні використовуватися в аналізі.
- Зчитувачі планшетів вимірюють вертикально. Не торкайтеся дна лунок.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1 Підготовка стандартів і контролів

Відновіть кожен флакон стандарту та контролю 0,75 мл дейонізованої H₂O перед використанням.

Важлива примітка: відновлені стандарти та контролі дуже чутливі до температури, тому ви повинні діяти так:

1. Розчиніть кожен флакон стандарту та контролю 0,75 мл дейонізованої води
2. Залиште на міксері приблизно на 5 хвилин
3. Візьміть необхідну аликвоту для аналізу та негайно аликвотуйте та заморозьте при -20 °C невикористані стандарти та контролі.

Відновлені стандарти та контролі стабільні 1 місяць при -20 °C; уникайте повторного заморожування та розморожування.

Стандарти мають приблизно такі концентрації:

	Стандарт А	Стандарт В	Стандарт С	Стандарт D	Стандарт Е
нг/мл	0	4	20	50	100

Правильні стандартні концентрації для обчислення кривої залежать від партії та вказані на етикетках стандартних флаконів і у звіті про контроль якості.

6.2 Розведений кон'югат

Готувати безпосередньо перед використанням.

Додайте 20 мкл кон'югату (реагент 4) до 1 мл інкубаційного буфера (реагент 3), кількість для приготування прямо пропорційна кількості аналізів.

Обережно перемішайте, залишивши в обертовому шейкері принаймні на 5 хвилин.

6.3 Приготування промивного розчину

Розведіть вміст концентрату промивного буфера (50X) до 1000 мл дистильованою або дейонізованою водою у відповідному контейнері для зберігання.

Для менших об'ємів дотримуйтеся співвідношення розведення 1:50.

Розведений буфер стабільний при 2 °C - 8 °C протягом принаймні 30 днів.

6.4 Підготовка зразка

Визначення hNSE можна проводити в сироватці крові людини.

Сироватку слід відокремити від крові протягом 60 хвилин, щоб уникнути збільшення hNSE з клітин крові.

Не використовуйте гемолізовані зразки.

Уникайте використання плазми, оскільки значні кількості hNSE можуть бути отримані з тромбоцитів.

Зразки можна зберігати при 2 °C - 8 °C протягом 1 дня; тривалий час зберігати при -20 °C.

Уникайте повторних циклів заморожування-розморожування. Не залишайте зразки при кімнатній температурі протягом тривалого часу.

6.5 Процедура

Дайте всім реагентам досягти кімнатної температури (22 °C - 28 °C) принаймні на 30 хвилин.

Після закінчення аналізу негайно зберігайте реагенти при 2 °C - 8 °C, уникайте тривалого впливу кімнатної температури (див. параграф 6.1 для стандартів і контролів).

Невикористані покриті мікролункові стрипи слід надійно помістити в пакет із фольги, що містить осушувач, і зберігати при температурі 2 °C - 8 °C.

Щоб уникнути можливого мікробного та/або хімічного забруднення, невикористані реагенти ніколи не слід переносити в оригінальні флакони.

Оскільки для підвищення точності результатів аналізу необхідно виконати визначення в двох примірниках, підготуйте дві лунки для кожної точки стандартної кривої (стандарт А – стандарт Е), дві для кожного контролю, дві для кожного зразка, одну для холостого зразка.

Реагент	Стандартний	Зразок/ контроль	Пустий
Стандарт А – Стандарт Е	25 мкл		
Зразок/ контроль		25 мкл	
Розведений кон'югат	100 мкл	100 мкл	
<p>Інкубуйте при кімнатній температурі (22 °С - 28 °С) протягом 1 години.</p> <p>Видаліть вміст із кожної лунки та промийте лунки 3 рази 300 мкл розведеного промивного розчину. Важлива примітка: під час кожного етапу миття обережно струшуйте планшет протягом 5 секунд і видаліть надлишок розчину, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому паперовому рушнику.</p> <p>Автоматична мийка: якщо використовуєте автоматизоване обладнання, промийте лунки не менше 5 разів.</p>			
Субстрат ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
<p>Інкубуйте при кімнатній температурі (22 °С - 28 °С) протягом 15 хвилин у темряві.</p>			
Стоп розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл
<p>Обережно струсіть мікропланшет. Зчитайте поглинання (Е) при 450 нм проти референтної довжини хвилі 620 - 630 нм або проти Бланка протягом 5 хвилин.</p>			

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати контрольні зразки в нормальному діапазоні високих інструкцій і низьких рівнів hNSE для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролю слід розглядати як невідомі, а значення визначати в кожній проведеній процедурі аналізування. Для відстеження ефективності наданих реагентів слід підтримувати карти контролю якості. Для встановлення тенденцій слід використовувати відповідні статистичні методи. Окрема лабораторія повинна встановити допустимі межі ефективності аналізу. Інші параметри, які слід контролювати, включають 80, 50 і 20% пересікань стандартної кривої для відтворюваності від серії до серії. Крім того, максимальна поглинання повинна відповідати минулому досвіду. Значні відхилення від встановлених показників можуть свідчити про непомічену зміну умов експерименту або погіршення якості реагентів набору. Щоб визначити причину відхилень, слід використовувати свіжі реагенти.

8. РЕЗУЛЬТАТИ

8.1 Середнє поглинання

Обчисліть середнє значення поглинання (Em), що відповідає окремим точкам стандартної кривої (стандарт А – стандарт Е) і кожного зразка.

8.2 Стандартна крива

Побудуйте графік значень поглинання (Em) стандартів (стандарт А – стандарт Е) проти концентрації. Накресліть криву, яка найкраще підходить, через нанесені точки. (наприклад, кубічний сплайн, сигмоподібна логістика або логістика чотирьох параметрів).

8.3 Розрахунок результатів

Інтерполуйте значення зразків на стандартній кривій, щоб отримати відповідні значення концентрацій, виражені в нг/мл.

9. РЕФЕРЕНТНІ ЗНАЧЕННЯ

Сироваткові значення містяться в наступних інтервалах:

	hNSE
Нормальний діапазон	0 - 12 нг/мл
Патологічне значення	> 12 нг/мл

Будь ласка, зверніть увагу на той факт, що визначення діапазону очікуваних значень для «нормальної» популяції в даному методі залежить від багатьох факторів, таких як специфічність і чутливість використовуваного методу та тип досліджуваної популяції.

Таким чином, кожна лабораторія повинна розглядати діапазон, наданий виробником, як загальну індикацію та виробляти власний діапазон очікуваних значень на основі корінного населення, де працює лабораторія.

10. ПРОДУКТИВНІСТЬ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Специфічність

Антитіло спрямоване спеціально проти специфічної енолази людського нейрона. Значення перехресної реактивності були розраховані на основі вага/вага.

NSE Фіцджеральд (Кат. № 30AN10 Лот. A99052602)	100 %
NNE Біогенез (Кат. 6880-1004 Лот. 991105A)	<0,22 %

10.2 Чутливість

Найнижча виявлена концентрація hNSE, яку можна відрізнити від стандарту А, становить 0,19 нг/мл при 95% довірчій межі.

10.3 Точність

10.3.1 В аналізі

Варіації в межах циклу визначали повторними вимірюваннями (16х) двох різних контрольних сироваток в одному аналізі.
Варіабельність у межах аналізу становить $\leq 4,4\%$.

10.3.2 Між аналізами

Варіації між серіями визначали повторними вимірюваннями (10х) двох різних контрольних сироваток у різних партіях. Варіабельність між аналізами становить $\leq 11,2\%$.

10.4 Кореляція

Набір NSE ІФА (x) порівнювали з іншим комерційно доступним аналізом hNSE (y).
28 зразків сироватки були проаналізовані відповідно до обох аналіз-систем.

Крива лінійної регресії:

$$(y) = 1,34 \times (x) -$$

$$0,66 \quad r^2 = 0,971$$

10.5 Ефект хука

Цей набір NSE ІФА не виявляє ефекту Хука до 5000 нг/мл hNSE.

11. УТИЛІЗАЦІЯ ВІДХОДІВ

Реагенти необхідно утилізувати відповідно до місцевих правил.

12. ЛІТЕРАТУРА

1. Соренсен К., Бродбек У., Паус Е., Норгаард-Педерсен Б. Імуноаналіз ферментного антигену для рішучість з нейронспецифічні енолаза в сироватка зразки. Clin Chim Acta. 1988 29 липня;175(3):337-43.
2. Дрівсхолм Л., Остерлінд К., Купер Е.Х., Пурвес Д.А. Нейрон-специфічна енолаза (NSE) у сироватці. Порівняння моноклонального та поліклонального аналізу на основі 392 зразків крові. Int J Biol Markers. 1995 Січень-березень;10(1):1-4.
3. Карнак Д, Бедер С, Каякан О, Ібіс Е, Офлаз Г. Нейрон-специфічна енолаза та рак легенів. Am J Clin Oncol. 2005 грудень;28(6):586-90.
4. Бергер Р.П., Дулані Т., Адельсон П.Д., Левенталь Дж.М., Річічі Р., Кочанек П.М. Ідентифікація нанесеної черепно-мозкової травми у немовлят гарного вигляду за допомогою сироваткових і цереброспінальних маркерів: можливий Скринінг інструмент. Педіатрія. Лютий 2006 р.; 117 (2): 325-32.
5. Ghayumi SM, Mehrabi S, Doroudchi M, Ghaderi A Діагностичне значення пухлинних маркерів для диференціації злоякісний і доброякісний плевральний випоти з іранських пацієнтів. Pathol Oncol Res. 2005;11(4):236-41. Epub 2005, 31 грудня.
6. Sawauchi S, Taya K, Murakami S, Ishi T, Ohtsuka T, Kato N, Kaku S, Tanaka T, Morooka S, Yuhki K, Urashima M, Abe T. Сироватковий білок S-100B і нейрон-специфічна енолаза після черепно-мозкової травми. Ні Шінкея Гека. 2005 Листопад;33(11):1073-80
7. Рамонт Л., Тоаннес Х., Волондат А., Частанг Ф., Міллет М.С., Макварт Ф.Х. Вплив гемолізу та умов зберігання на нейрон-специфічну енолазу (NSE) у спинномозковій рідині та сироватці крові: значення в клінічній практиці. Clin Chem Lab Med. 2005;43(11):1215-7.

Символи:

	Зберігання температура		Виробник		Містить достатньо для <n> аналізів
	Термін придатності		Код партії		Для діагностики in vitro використовувати тільки!
	Зверніться до інструкцій для використання	LOT		IVD	
		CONT	Зміст	CE	Маркування CE
	Обережно	REF	Каталог номер		