НАБІР РЕАГЕНТІВ

НСЕ (НЕЙРОСПЕЦИФІЧНА ЕНОЛАЗА) ELISA

NSE ELISA

Кат. №: ***EIA-4610*** *Дата випуску інструкції*: ***2019/05***
Версія ***13.0***

Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імноферментний колориметричний метод для кількісного визначення концентрації НСЕ у людській сироватці. Набір НСЕ ІФА призначений тільки для лабораторного використання.

1.1 Клінічне значення

Нейронспецифічна енолаза (2-фосфо-D-гліцерат гідролаза) – це ізофермент, який належить до сімейства енолази (гомо- та гетеродимер, що складається із α, β та γ субодиниць), який відрізняється від них наявністю специфічного γγ гетеродимеру.
Клінічну корисність НСЕ-подібного маркера пухлини порівнюють з недрібноклітинним раком легенів (НМРЛ), нейробластомою, медулярною карциномою щитовидної залози, пухлиною клітин підшлункової залози та непухлинним станом нейрональних захворювань та мозкової травми.

2. ПРИНЦИП

Даний тест базується на одночасному зв'язуванні людської Нейронспецифічної Енолази двома моноклональними антитілами, одне з яких іммобілізується на мікролукомвому планшеті, а інше – кон'югує з пероксидазою хрону (HPR).
Після інкубації поділ зв'язування/вивільнення проводять простим твердофазним промиванням, після чого додають розчин ТМВ-Субстрату (ТМБ). Після закінчення відповідного часу для максимального розвитку кольору, ферментна реакція зупиняється і визначається абсорбція.
Інтенсивність забарвлення – пропорційна концентрації НСЕ у зразку.
Концентрацію НСЕ у зразку вимірюють за допомогою Калібрувальної кривої.

3. РЕАГЕНТИ, МАТЕРІАЛИ ТА ІНСТРУМЕНТИ

3.1 Реагенти та матеріали, які постачаються з набором

1. **Стандарти (CAL0-CAL4),** 2 флакони кожний Калібратор, ліофілізовані;
   уважно прочитайте пункт 6.1
2. **Контролі**,2 флакони кожний калібратор, ліофілізовані;
   Негативний і Позитивний Контроль
   уважно прочитайте пункт 6.1
3. **Інкубаційний буфер**,1 флакон, 50 мл.
   Фосфатний буфер 50 мМ pH 7.4; BSA 1 г/л.
4. **Кон'югат**, 1 флакон, 1 мл.
   Моноклональне антитиіло до НСЕ людини, кон'юговане з пероксидазою хрону (HRP).
5. **Мікропланшет**, 1 роздільний мікропланшет.
   Моноклональне антитіло до НСЕ людини, абсорбоване на мікропланшеті.
6. **ТМВ субстрат**,1 флакон, 15 мл.
   H_2O_2-ТМВ 0.26 г/л (уникати попадання на шкіру)
7. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 15 мл,
   Сірчана кислота 0.15 моль/л (уникати попадання на шкіру)
8. **Концентрат промивного розчину 50х**, 1 флакон, 20 мл. NaCl 45 г/л; Tween-20 (55 г/л)

3.2 Необхідні реагенти, які не постачаються

Дистильована вода.

3.3 Додаткові матеріали та інструменти

Автоматичний диспенсер.
Мікропланшетний зчитувач (450 нм, 620-630 нм)

Примітки

Стандарти та контролі містять НСЕ людини у білковому стабілізуючому розчині матриці.
Зберігати усі реагенти при температурі 2-8 °С у темному місці.
Відкрийте упаковку з реагентом 4 (Покритий мікропланшет) тільки , коли він кімнатної температури та негайно закрийте після використання.
Після відкриття, планшет стабільний до закінчення терміну придатності.

4. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Даний набір призначений тільки для in vitro використання тільки спеціалізованим персоналом. Не для внутрішнього чи зовнішнього використання до людей чи тварин.
- Під час роботи з даними реагентами слід використовувати відповідне захисне обладнання.
- Дотримуйтесь належної лабораторної практики (GLP) щодо поводження з продуктами крові.
- Реагенти містять невелику кількість Прокліну 300 в якості консерванту. Уникати контакту зі шкірою та слизовими.
- Субстрат ТМВ містить подразник, який може бути шкідливим при вдиханні, потраплянні всередину або всмоктуванні через шкіру. Щоб запобігти травмуванню, уникайте вдихання, потрапляння всередину або контакту зі шкірою та очима.
- Стоп-розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота отруйна і їдка, і може бути токсичною при попаданні всередину. Щоб запобігти хімічним опікам, уникайте контакту зі шкірою та очима.
- Уникайте попадання реагенту ТМВ/H_2O_2 під пряме сонячне світло, на метали чи оксиданти. Розчин не заморожувати.
- Такий метод дозволяє визначати НСЕ людини всередині діапазону CAL 0 - CAL 4.
  Значення калібратора специфічні для партії.

5. ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

- Будь ласка, чітко дотримуйтесь послідовності кроків піпетування, яка передбачена у цій інструкції. Наведені дані щодо ефективності, отримані з використанням конкретних реагентів, зазначених у цій Інструкції з використання.
- Увсіреагенти слід зберігати охолодженими при температурі 2 – 8 °С в оригінальній упаковці. Будь-які винятки чітко зазначені на упаковці. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності при зберіганні та обробці, як зазначено.
- дозволити усім компонентам та усім зразкам досягнути кімнатної температури (22-28°С) та добре перемішати перед використанням.
- Не замінюйте компоненти набору на компоненти з різними лотами. Необхідно дотримуватися терміну придатності, надрукованого на етикетках коробки та флаконах. Не використовуйте будь-який компонент набору після закінчення терміну придатності.
- Якщо ви використовуєте автоматизоване обладнання, користувач несе відповідальність за те, щоб набір був належним чином протестований.
- Неповне або неточне видалення рідини із лунок може вплинути на точність аналізу та / або збільшити фон. Для підвищення продуктивності набору на автоматичних системах рекомендується збільшити кількість промивань.
- Важливо, щоб час реакції в кожній лунці був постійним для відтворюваних результатів. Піпетування зразків не повинно тривати більше десяти хвилин, щоб уникнути зміщення аналізу. Якщо потрібно більше 10 хвилин, дотримуйтесь того самого порядку додавання. Якщо використовується більше одного планшету, рекомендується повторити криву реакції на дозу для кожного планшету.
- Додавання розчину субстрату ТМВ спричиняє кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп-розчину. Тому, субстрат ТМВ та Стоп-розчин слід додавати в одній послідовності, щоб усунути будь-які відхилення в часі під час реакції.
- Дотримуйтесь рекомендацій щодо проведення контролю якості в медичних лабораторіях, аналізуючи контролю та / або об'єднані сироватки.
- Для відновлення та додавання реагентів потрібна максимальна точність.
- Зразки, мікробіологічно забруднені, сильноліпемічні або гемолізовані, не слід використовувати для аналізу.
- Зчитувачі планшетів вимірювати вертикально. Не торкайтесь дна лунок.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1 Приготування Стандартів і Контролів

Перед використанням розвести стандарти і контролі з 0.75 мл деіонізованої води.

Важлива примітка: відновлені Стандарти та Контролі дуже чутливі до температури, тому слід виконати наступне:

1. Розвести кожну лунку зі Стандартом та Контролем з 0.75 мл деіонізованої води.
2. Залишити в міксері на 5 хвилин.

3. Взяти необхідну кількість для аналізу і **негайно** аліквотувати, а невикористані Стандарти та Контролі заморозити при температурі -20°C.

Розведені Стандарти і Контролі стабільні 1 місяць при температурі -20 °C; уникати повторних циклів замороження-розмороження.

Приблизні концентрації Калібраторів наступні:

	CAL0	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4
нг/мл	0	4	20	50	100

Правильні концентрації стандартів для обчислення кривої є характерними для окремого лоту та вказані на етикетках флаконів із стандартами та у сертифікаті аналізу.

6.2 Розведений кон'югат

Приготувати безпосередньо перед використанням.

Додати 20 мкл Кон'югату (реагент 4) до 1 мл Інкубаційного буферу (реагент 3). Кількість розведеного кон'югату пропорційна кількості тестувань.

Обережно перемішуйте, залишивши на обертовому шейкері принаймні на 5 хвилин.

6.3 Приготування промивного розчину

Розвести вміст буферного промивного концентрату (50X) дистильованою або деіонізованою водою до 1 л у відповідному контейнері для зберігання.

Для отримання менших об'ємів виконати розведення за співвідношенням 1:50.

Після розведення буфер стабільний щонайменше 30 днів при температурі 2-8°C.

6.4 Приготування зразка

Визначення НСЕ людини слід проводити на сироватці.

Сироватку слід відділити від крові протягом 60 хвилин, щоб уникнути збільшення рівня НСЕ людини від вивільнення клітин крові.

Не використовувати гемолізовані зразки. Уникайте використання плазми, оскільки з тромбоцитів може потрапляти значна кількість НСЕ людини.

Зразки можна зберігати при температурі 2 ° C - 8 ° C протягом 1 доби; для тривалого зберігання - при температурі -20 ° C.

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

6.5 Процедура

Дозвольте всім реагентам досягнути кімнатної температури (22°C - 28°C) прйнамні протягом 30 хвилин.

Наприкінці аналізу слід зберігати реагенти при температурі від 2 ° C до 8 ° C, щоб уникнути тривалого впливу кімнатної температури (див. Параграф 6.1 для Калібраторів та Контролів).

Невикористані покриті мікролункові смужки слід надійно поставити у фольгований мішок, що містить осушувач, і зберігати при температурі від 2 ° C до 8 ° C.

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

Оскільки, визначення потрібно проводити у двох примірниках, щоб підвищити точність результатів випробувань, підготуйте дві лунки для кожної точки калібрувальної кривої (CAL 0 - CAL 4), дві для кожного Контролю, по дві для кожного зразка, одну для Бланку.

Реагент	**Калібратор**	**Зразок/Контролі**	**Бланк**
CAL0 - CAL4	**25 мкл**		
Зразок/контролі		**25 мкл**	
Розведений кон'югат	**100 мкл**	**100 мкл**	
Інкубувати при кімнатній температурі (22-28°C) протягом 1 години. Видаліть вміст з кожної лунки і 3 рази промийте лунки з 300 мкл розведеного промивного розчину. Важливе зауваження: під час кожного етапу миття обережно струшуйте планшет протягом 5 секунд і видаліть надлишки розчину, постукуючи перевернутою пластиною по абсорбуючому паперовому рушнику. Автоматичне промивання: якщо ви використовуєте автоматизоване обладнання, промивайте лунки принаймні 5 разів.			
Розчин субстрату	**100 мкл**	**100 мкл**	**100 мкл**
Інкубувати при кімнатній температурі (22-28°C) протягом 15 хвилин у темряві.			
Стоп-розчин	**100 мкл**	**100 мкл**	**100 мкл**
Обережно потрясти планшет. Зчитати абсорбцію (E) при 450 нм до референсної довжини хвилі 620-630 нм або до Бланку протягом 5 хвилин.			

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ефективності аналізу кожна лабораторія повинна проводити аналізувати контролі в межах нормального, високого та низького рівнів НСЕ людини. Ці контролі слід розглядати як невідомі величини та значення, що визначаються в кожній проведеній процедурі тестування. Для контролю ефективності реагентів, які постачаються, слід вести таблиці контролю якості. Для встановлення тенденцій слід застосовувати відповідні статистичні методи. Індивідуальна лабораторія повинна встановити допустимі межі ефективності аналізу. Інші параметри, за якими слід стежити, включають 80, 50 та 20% відрізки калібрувальної кривої для відтворюваності циклу в кожній процедурі. Крім того, максимальна абсорбція повинна відповідати минулому досвіду. Значне відхилення від встановлених показників може свідчити про непомітну зміну експериментальних умов або погіршення стану реагентів. Для визначення причини змін слід використовувати нові реагенти.

8. РЕЗКЛЬТАТИ

8.1 Середня абсорбція

Обчисліть середнє значення абсорбції (Em), що відповідає окремим точкам калібрувальної кривої (CAL 0-CAL 4) і кожному зразку.

8.2 Калібрувальна крива

Побудуйте графіки значень абсорбції (Em) Калібраторів (CAL 0 - CAL 4) щодо концентрації. Накресліть найбільш підходящу криву через намічені точки. (наприклад: кубічний сплайн, сигмоподібна логістика або чотирипараметрична логістика).

8.3 Обчислення результатів

Інтерполюйте значення зразків на калібрувальній кривій, щоб отримати відповідні значення концентрацій, виражені в нг/мл.

9. РЕФЕРЕНСНІ ЗНАЧЕННЯ

Значення сироватки знаходяться у наступних інтервалах:

	НСЕ людини
Діапазон норми	0 – 12 нг/мл
Патологічне значення	> 12 нг/мл

Будь ласка, зверніть увагу на той факт, що визначення діапазону очікуваних значень для "нормального" населення за певним методом залежить від багатьох факторів, таких як специфічність та чутливість використовуваного методу та тип населення, яке досліджується.

10. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Специфічність

Антитіло спрямоване конкретно проти людської нейроноспецифічної енолази. Значення перехресної реактивності були розраховані на основі ваги/ваги:

НСЕ Фіцжеральда (Кат. номер 30AN10 Лот A99052602	100%
НСЕ біогенезу (Кат. 6880-1004 Лот 991105A)	<0.22%

10.2 Чутливість

Найнижча концентрація НСЕ людини, яку можна визначити і яку можна відрізнити від Калібратора 0, становить 0.19 нг / мл при довірчій межі 95%.

10.3 Точність

10.3.1 В аналізі

Варіації протягом аналізу визначали шляхом повторних вимірювань (16x) двох різних контрольних сироваток в одному аналізі. Варіабельність в аналізі становила ≤ 4.4%.

10.3.2 Між аналізами

Варіації між аналізами визначали шляхом повторних вимірювань (10x) двох різних контрольних сироваток у різних лотах. Варіабельність між аналізами становила ≤ 11.2%.

10.4 Кореляція

Набір НСЕ ІФА (EIA-4610) порівнювали з іншим комерційно доступним аналізом НСЕ людини (EIA-2353). 28 зразків сироватки було проаналізовано відповідно до обох тест-систем.

Крива лінійної регресії становила:

(EIA-2353) = 1.34 × (EIA-4610) – 0.66

$r^2 = 0.971$

10.5 "Хук-ефект"

Даний набір не показав «хук-эффекта» при концентрації НСЕ людини до 5000 нг/мл.

11. ПРАВИЛА УТИЛІЗАЦІЇ
Реагенти слід утилізовувати відповідно до місцевих вимог.

ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drg@drg-diagnostics.de

УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua