

Instructions for use **S 100B ELISA**



TM E-4800



S100B ELISA

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of S100B concentration in serum.

CLINICAL SIGNIFICANCE

S100 is a 20 kDa protein belonging to the S100/calmodulin/troponin C superfamily of EF-hand calcium-binding proteins. S100 was originally isolated from human brain and considered a glial-cell specific protein (1). Today, 20 monomers of the S100 family have been identified based on structural and functional similarities (2,3). Most of the S100 proteins exist as dimers and are expressed in a cell-specific manner. Two of the S100 monomers, designated S100 α and S100 β (4) are highly conserved between species and are found as homo-($\beta\beta$) and heterodimers ($\alpha\beta$) in central nervous system glial cells and in certain peripheral cells eg. Schwann cells, melanocytes, adipocytes, and chondrocytes (5). S100 $\alpha\beta$ and S100 $\beta\beta$ are also present in malignant tissues, most notably in melanoma and to a lesser extent in glioma, thyroid cell carcinoma and renal cell carcinoma (2). Determination of S100B (like S100 $\alpha\beta$ and S100 $\beta\beta$ units) in serum has been shown to be clinically useful for prognosis and treatment monitoring of patients diagnosed with malignant melanoma (6-9). Studies also suggest that S100B may be useful in the management of patients with brain damage from eg. traumatic head injury, perinatal asphyxia, cardiac arrest, cardiac surgery and stroke (10-13).

Principle

The S100B ELISA TEST is based on binding of S100B by two antibodies, one immobilized on microwell plates, and the other one conjugates with horseradish peroxidase (HRP).

The assay is on two steps binding procedure and after every incubation step, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing, then the substrate solution (TMB) is added. After an appropriate time has elapsed for maximum color development, the enzyme reaction is stopped and the absorbances are determined. The S100B concentration in the sample is calculated based on a series of standard.

The color intensity is proportional to the S100B concentration in the sample.

Reagent, material and instrumentation

Reagent and material supplied in the kit.

Standards

	Cat. no.	Standard	Concentration	Volume/Vial
STANDARD A	TM E-4801	Standard 0	0 pg/mL	1 ml
STANDARD B	TM E-4802	Standard 1	80 pg/mL	1 ml
STANDARD C	TM E-4803	Standard 2	160 pg/mL	1 ml
STANDARD D	TM E-4804	Standard 3	320 pg/mL	1 ml
STANDARD E	TM E-4805	Standard 4	2000 pg/mL	1 ml
STANDARD F	TM E-4806	Standard 5	4500 pg/mL	1 ml

6x (1 vial = lyophilized); STD0 - STD5

CONTROL 1 + CONTROL 2 **TM E-4851 + TM E-4852 Controls**

2x (1 vial = lyophilized); Negative Control; Positive Control

CONJUGATE-BUFF **TM E-4839 Conjugate buffer**

(1 bottle) 20 mL; Tris buffer; BSA 10 g/L, Tween 0.05%

CONJUGATE-CONC **TM E-4840 Conjugate**

(1 vial) 0.6 mL; Anti-S100B-HRP conjugate

ASSAY-BUFF **TM E-4813 Assay buffer**

(1 bottle) 12 mL; Tris buffer; BSA 10 gr/L, stabilizing reagent

96 **TM E-4831 Coated microplate**

(1 microplate breakable); Anti-S100B adsorbed on microplate

SUBSTRATE **MS E-0055 TMB-Substrate**

(1 bottle) 12 mL; H_2O_2 -TMB 0.25 g/L (avoid any skin contact)

STOP-SOLN **MS E-0080 Stop solution**

(1 bottle) 12 mL; Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

WASH-CONC 50x **SA E-0030 Conc.wash solution 50x**

(1 bottle) 20 mL; NaCl 45g/L Tween 20 55g/L

Necessary reagents not supplied with the kit

Distilled water.

Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader

Notes

Store all reagents between +2°C - 8°C in the dark.

Open the bag of reagent 6 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close immediately after use.

Do not remove the adhesive sheets on the strips unutilized

PRECAUTION

- The reagents contain Merthiolate Sodium as preservative.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- All the reagents have a lot to lot consistency; do not mix various lot numbers kits components within a test.
- This method allows the determination of S100B from 10 to 5000 pg/mL.
- The calibrator concentrations are lot specific and are reported on the vial labels.
- Do not use heavily hemolysed samples
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to direct sunlight, metals or oxidants.

PROCEDURE**Preparation of the sample**

The S100B determination must be carried out on serum. Do not use hemolyzed samples.

Samples can be stored at +2°C - 8°C for 1 day; for long periods store at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Do not allow the samples at room temperature for long period.

For sample with concentration higher than 5 ng/mL dilute the sample with Assay buffer

Preparation of the Standards and Controls

Reconstitute standards and controls with 1 mL of distilled water before use;

once reconstituted they are stable for 4 weeks at 2°C – 8°C and about six month if stored at -20°C.

It is advised to divide the content in aliquots and store them at -20°C.

The values of standard concentrations are reported on vial label.

Avoid repeated freeze-thaw cycles and long time exposure at room temperature.

Preparation of the Conjugate

Prepare 2 hour before use.

Add 50 µL Conjugate (reagent 4) to 1.0 mL of Conjugate Buffer (reagent 3).

(The quantity of diluted conjugate is proportional to the number of tests).

Mix gently for 5 minutes, with rotating mixer.

Stable for 3 hours at room temperature.

Preparation of the wash solution

Dilute 10 mL of Wash Solution Concentrate (50x) with 490 ml of distilled or deionized; for different volumes keep dilution ratio. Store at room temperature until the expiry date write on the wash solution concentrate label.

Procedure

As it is necessary to perform the determination in duplicate, prepare two wells for each point of the standard curve (S_0 - S_5), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Pipette:

Reagent	Standard	Sample	Blank
Standard S_0 - S_5 , Controls	50 μ L		
Sample		50 μ L	
Assay Buffer	50 μ L	50 μ L	
Incubate 2 h at room temperature ($22 \div 28^\circ\text{C}$). Remove the contents from each well, wash the wells three times with 300 μ L of diluted wash solution			
Diluted Conjugate	100 μ L	100 μ L	
Incubate 1 h at room temperature ($22^\circ\text{C} - 28^\circ\text{C}$). Remove the contents from each well, wash the wells three times with 300 μ L of diluted wash solution			
TMB-Substrate	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubate 30 minutes at room temperature $22 \div 28^\circ\text{C}$, in the dark.			
Stop solution	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Read the absorbance (E) at 450 nm against Blank			

RESULTS

Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbencies (E_m) for each point of the standard curve and of each sample.

Standard Curve

Plot the values of absorbance of the standards ($S_0 - S_5$) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (e.g.: Cubic spline or Four Parameter Logistic).

Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations in pg/mL.

REFERENCES VALUES

Each laboratory must establish its own normal ranges based on patient population:

Normal range: Mean = 50 pg/mL; SD = 15 pg/mL

Pathological limit: > 75 pg/mL

Performance Characteristics

Specificity

The antibody recognizes specifically the β subunit therefore reacts with S100 $\alpha\beta$ and S100 $\beta\beta$ units.

It is not reactive against the S100 $\alpha\alpha$ unit.

Cross-reacts with S100 from bovine, porcine, rabbit cat and rat.

Does not react with the other EF-hand family proteins.

Sensitivity

The minimal detectable concentration of S100 β by this assay is estimated to be 10 pg/mL.

Limitations of Use:

In this assay, no hook effect is observed up to 5000 pg/mL of S100B

WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations

BIBLIOGRAPHY

1. Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739-744.
2. Zimmer DB et al., (1995) The S100 protein family history, function and expression. *Brain Res Bull* 37:417-429.
3. Heizmann CW et al., (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7:1356-1368.
4. Schäfer BW et al. (1995) Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25:638-643.
5. Takahashi K et al., (1984) Immunohistochemical study on the distribution of α and β subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch* 45:385-396.
6. Banfalvi T et al., (2003) Use of serum S-100 and S-100B protein levels to monitor the clinical course of malignant melanoma. *Eur J Cancer* 39:164-169.
7. Djureen-Mårtensson E, et al., (2001) Serum S-100b protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:824-831.
8. Hauschild A et al., (1999) S100B protein detection in serum is significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology* 56:338-344.
9. Wunderlich MT et al., (1999) Early Neurobehavioral Outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30:1190-1195.
10. Martens P et al., (1998) Serum S100 and neuron specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke* 29:2363-2366.
11. Rosén H et al., (1998) Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 29: 473-477.
12. Ingebrigtsen T et al., (2000) The clinical value of serum S-100 protein measurements in minor head injury: a Scandinavian multicenter study. *Brain Inj* 14:1047-1055
13. Michetti F and Gazzolo D (2002) S100B protein in biological fluids: A tool for perinatal medicine *Clin Chem* 48:2097-2104
14. Stigbrand T, Nyberg L, Ullen A, Haglid K, Sandstrom E, Brundell J. A new specific method for measuring S-100B in serum. *Int J Biol Markers*. 2000 Jan-Mar;15(1):33-40.
15. Chen DQ, Zhu LL. Dynamic change of serum protein S100b and its clinical significance in patients with traumatic brain injury.. *Chin J Traumatol*, 2005 Aug 1;8(4):245-8.
16. Sawauchi S, Taya K, Murakami S, Ishi T, Ohtsuka T, Kato N, Kaku S, Tanaka T, Morooka S, Yuhki K, Urashima M, Abe T. Serum S-100B protein and neuron-specific enolase after traumatic brain injury. *No Shinkei Geka*. 2005 Nov;33(11):1073-80

TROUBLESHOOTING

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers -insufficient washing (conjugates not properly removed)

too high within-run CV%

- reagents and/or strips not pre-warmed to Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

too high between-run CV %

- incubation conditions not constant (time, temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		For research use only!

S100B

Determinación inmunoenzimática directa de S100B en suero o plasma humano

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de S100B en suero o plasma humano.

El kit S100B está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La S100 es una proteína de 20 kDa que pertenece a la superfamilia S100/calmodulina/troponina C de las proteínas EF de unión de calcio. La S100 inicialmente se aisló del cerebro humano y se consideró como una proteína específica de las células gliales (1). Actualmente, se han identificado 20 monómeros de la familia S100 basándose en las semejanzas estructurales y funcionales (2,3). La mayor parte de las proteínas S100 existen como dímeros y tienen una expresión específica de células. Dos de los monómeros S100, S100 α y S100 β (4), están altamente conservados entre las especies y se encuentran como homodímeros ($\beta\beta$) y heterodímeros ($\alpha\beta$) en las células gliales del sistema nervioso central y en algunas células periféricas, como las células de Schwann, melanocitos, adipocitos y condrocitos (5).

S100 $\alpha\beta$ y S100 $\beta\beta$ también están presentes en los tejidos malignos, en mayor modo en el melanoma y en menor medida en el glioma, en el carcinoma de las células tiroideas y en el carcinoma de las células renales (2).

Se ha demostrado que la determinación de S100B (como unidad S100 $\alpha\beta$ y S100 $\beta\beta$) en suero es clínicamente útil para el pronóstico y la supervisión del tratamiento de los pacientes con un diagnóstico de melanoma maligno (6-9). Los estudios también sugieren que S100B puede ser útil para la gestión de los pacientes con daño cerebral, por ejemplo, trauma por lesión en la cabeza, asfixia perinatal, paro cardíaco, ictus y trauma debido a una cirugía cardíaca (10-13).

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ENSAYO S100B ELISA se basa en la captura en dos fases de S100B por parte de un anticuerpo inmovilizado en la microplaca y otro anticuerpo conjugado con peroxidasa (HPR).

El método se basa en dos fases distintas, en cada una de las cuales, tras un determinado período de incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

La enzima presente en la fracción unida, que reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB (TMB), desarrolla una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de interrupción (H_2SO_4).

La concentración de S100B en la muestra se calcula tomando como base una serie de estándares.

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de S100B presente en la muestra.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3,1 Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Estándares (STD) de S100B (6 frascos, liofilizados)

STD0

REF DCE002/7406-0

STD1

REF DCE002/7407-0

STD2

REF DCE002/7408-0

STD3

REF DCE002/7409-0

STD4

REF DCE002/7410-0

STD5

REF DCE002/7411-0

2. Controles (2 frascos, liofilizados)

Control negativo

REF DCE045/7401-0

Control positivo

REF DCE045/7402-0

3. Tampón de conjugado (1 frasco, 20 ml)

Tampón de tris, BSA 10 g/l, tween 0,05%

REF DCE044-0

4. Conjugado (1 frasco, 1 ml)

Conjugado de anti-S100B-HRP

REF DCE002/7402-0

5. Tampón de ensayo (1 frasco, 12 ml)

Tampón de tris; BSA 10 g/l, estabilizante

REF DCE043-0

6. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)
Anti-S100B absorbido en la microplaca

REF DCE002/7403-0

7. Substrato TMB (1 frasco, 15 ml)
H₂O₂-TMB 0,25g/l (*evitar el contacto con la piel*)

REF DCE004-0

8. Solución de interrupción (1 frasco, 15 ml)
Ácido sulfúrico 0,15 M (*evitar el contacto con la piel*)

REF DCE005-0

9. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 ml)
NaCl 45g/l Tween20 55g/l

REF DCE006-0

3.2 Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3 Material auxiliar e instrumentación

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm).

Nota

Conservar todos los reactivos a 2-8 °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 6 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar.

No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

4. PRECAUCIONES

- Los reactivos contienen sodio mertiolato como conservante.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y en la dispensación de los reactivos.
- No usar reactivos de distintos lotes.
- Este método permite determinar concentraciones de S100B de 10 pg/ml a 5000 pg/ml
- La concentración de los estándares que se debe usar para el cálculo de la recta es específica para cada lote y se indica en la etiqueta de cada frasco de estándar.
- No usar muestras muy hemolizadas.
- Evitar la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz directa del sol, metales u oxidantes.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Preparación de la muestra

La determinación de S100B puede realizarse en suero o plasma humano. No usar muestras hemolizadas.

Las muestras pueden conservarse a 2-8 °C durante 24 horas. Para períodos más largos, conservarlas a -20 °C. No congelar y descongelar las muestras repetidamente. Evitar mantener las muestras durante largos períodos a temperatura ambiente.

Para muestras con una concentración superior a 5 ng/ml, diluir la muestra con tampón de ensayo.

5.2 Preparación de los estándares y los controles

Reconstituir los estándares y los controles con 1 ml de agua destilada antes del uso. Una vez reconstituidos, permanecen estables durante 4 semanas aproximadamente a 2-8 °C, 6 meses aproximadamente si se congelan a -20 °C. Se recomienda conservar en alícuotas el contenido reconstituido. El valor de la concentración de los estándares se indica en la etiqueta. Evitar ciclos de descongelación y exposiciones prolongadas a temperatura ambiente (22-28 °C).

5.3 Preparación del conjugado

(Preparar 2 horas antes del uso)

Añadir 50 µl de conjugado (reactivo 4) a 1 ml de tampón de conjugado (reactivo 3). La cantidad de conjugado que se debe preparar es proporcional al número de ensayos.

Mezclar con cuidado dejando al menos 5 minutos en el agitador giratorio. Estable durante 3 horas a temperatura ambiente (22-28 °C).

5.4 Preparación de la solución de lavado

Diluir 10 ml de solución de lavado concentrada (50x) con 490 ml de agua destilada o desionizada. Para volúmenes distintos, mantener la relación de dilución. Mantener a temperatura ambiente (22-28 °C) hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la solución de lavado concentrada.

5.5 Procedimiento

Puesto que es necesario operar por duplicado, preparar dos pocillos para cada punto de la curva estándar (S_0 - S_5), dos para cada control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Dispensar:

Reactivo	Estándar	Muestra/ Controles	Blanco
Estándares S_0 - S_5	50 μ l		
Muestra/ Controles		50 μ l	
Tampón de ensayo	50 μ l	50 μ l	
Incubar 2 h a temperatura ambiente (22÷28 °C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos tres veces con 300 μ l de solución de lavado diluida			
Conjugado diluido	100 μ l	100 μ l	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22÷28 °C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos tres veces con 300 μ l de solución de lavado diluida			
Substrato TMB	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22÷28 °C), protegida de la luz.			
Solución de interrupción	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente al blanco.			

6. RESULTADOS

6.1 Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva estándar y de cada muestra.

6.2 Curva estándar

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los estándares (S_0 - S_5) dibujando la curva que se aproxime mejor al valor de los puntos de la curva estándar (p. ej.: modelo spline cúbico, logístico de cuatro parámetros).

6.3 Cálculo de los resultados

Interpolar en el gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en pg/ml.

7. VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango basándose en la población de los pacientes.

Rango de normalidad: Media = 50 pg/ml SD = 15 pg/ml

Rango patológico: > 75 pg/ml

8. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

8.1 Especificidad

El anticuerpo reconoce específicamente la subunidad β y, por lo tanto, reacciona contra las unidades S100 $\alpha\beta$ y S100 $\beta\beta$; no es activo contra la unidad S100 $\alpha\alpha$. Reactividad cruzada con S100 bovina, porcina, de conejo, de gato y de rata. No se ha producido reactividad cruzada con otras proteínas de la familia mano EF.

8.2 Sensibilidad

La concentración mínima de S100B que se puede determinar con este ensayo es 35,27 pg/ml.

8.3 Limitaciones de uso

En este método no se ha observado efecto gancho hasta 5000 pg/ml de S100B

9. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739-744.
2. Zimmer DB et al., (1995) The S100 protein family history, function and expression. *Brain Res Bull* 37:417-429.
3. Heizmann CW et al., (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7:1356-1368.
4. Schäfer BW et al. (1995) Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25:638-643.
5. Takahashi K et al., (1984) Immunohistochemical study on the distribution of α and β subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch* 45:385-396.
6. Banfalvi T et al., (2003) Use of serum S-100B protein levels to monitor the clinical course of malignant melanoma. *Eur J Cancer* 39:164-169.
7. Djureen-Mårtensson E, et al., (2001) Serum S-100b protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:824-831.
8. Hauschild A et al., (1999) S100B protein detection in serum is significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology* 56:338-344.
9. Wunderlich MT et al., (1999) Early Neurobehavioral Outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30:1190-1195.
10. Martens P et al., (1998) Serum S100 and neuron specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke* 29:2363-2366.
11. Rosén H et al., (1998) Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 29: 473-477.
12. Ingebrigtsen T et al., (2000) The clinical value of serum S-100 protein measurements in minor head injury: a Scandinavian multicenter study. *Brain Inj* 14:1047-1055
13. Michetti F and Gazzolo D (2002) S100B protein in biological fluids: A tool for perinatal medicine *Clin Chem* 48:2097-2104
14. Stigbrand T, Nyberg L, Ullen A, Haglid K, Sandstrom E, Brundell J. A new specific method for measuring S-100B in serum. *Int J Biol Markers*. 2000 Jan-Mar;15(1):33-40.
15. Chen DQ, Zhu LL. Dynamic change of serum protein S100b and its clinical significance in patients with traumatic brain injury.. *Chin J Traumatol*, 2005 Aug 1;8(4):245-8.
16. Sawauchi S, Taya K, Murakami S, Ishi T, Ohtsuka T, Kato N, Kaku S, Tanaka T, Morooka S, Yuhki K, Urashima M, Abe T. Serum S-100B protein and neuron-specific enolase after traumatic brain injury. *No Shinkei Geka*. 2005 Nov;33(11):1073-80