

NT-proBNP

(EN) ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF NT-proBNP
IN HUMAN SERUM AND EDTA PLASMA
CAT. NO. SK-1204 12 X 8 TESTS

(DE) ENZYME IMMUNOASSAY FÜR DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON NT-proBNP
IN HUMANEN SERUM UND EDTA PLASMA PROBEN
KAT. NR. SK-1204 12 X 8 TESTE

(FR) KIT DE DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION DE LA
CONCENTRATION EN NT-proBNP DANS LE SERUM ET LE PLASMA EDTA HUMAIN
REF. SK-1204 12 X 8 TESTS

(IT) SAGGIO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI
NT-proBNP NEL SIERO, PLASMA-EDTA UMANI
CODICE. SK-1204 12 X 8 DERMINAZIONI

rev.no. 220524 (replacing 190104)

This kit was developed and manufactured by:

Biomedica Medizinprodukte GmbH, A-1210 Wien, Divischgasse 4

Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 6389, E-mail info@bmgrp.com



BIOMEDICA
IMMUNOASSAYS

CONTENT / INHALT / SOMMAIRE / CONTENUTO

ENGLISH	3
DEUTSCH	7
FRANCAIS	10
ITALIANO	13

Additional information on our products is available on our website.
Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich.
Pour toute information complémentaire sur nos produits, visiter notre site Internet.
Ulteriori informazioni sui nostri prodotti sono disponibili sulla nostra home page.

www.bmgrp.com

Authorized Representative for Registration:

mdi Europa GmbH
Langenhagener Str. 71
D-30855 Hannover-Langenhagen

1) INTRODUCTION

BNP is mainly expressed by ventricular myocardium in response to volume overload and increased filling pressure. BNP has a cleavable signal sequence. Mature BNP consists of 108 amino acids (proBNP or BNP-108), and undergoes cleavage resulting in physiologically active BNP-32 and additional C-terminal fragments (cf.

http://www.uniprot.org/uniprot/P16860#PRO_000001532), along with a physiologically inactive N-terminal peptide comprising amino acids 1-76, which is further degraded proteolytically.

BNP has a key role in cardiovascular homeostasis with biological actions including natriuresis, diuresis, vasorelaxation, and inhibition of renin and aldosterone secretion. A high concentration of BNP in the bloodstream is indicative of heart failure.

Areas of Interest

- Cardiac impairment, acute myocardial infarction, (left ventricular dysfunction)
- Renal failure
- Obesity and diabetes
- Various forms of secondary hypertension
- Therapy monitoring of heart failure patients

2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	polyclonal sheep anti NT-proBNP antibody coated microtiter strips in stripholder packed in alu bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer, 20x concentrated, clear cap	1 x 50 ml
STD	Standards, synthetic human NT-proBNP (0, 10, 40, 160, 640 pmol/l), lyophilised, white caps	5 vials
CTRL	Controls, synthetic human NT-proBNP, lyophilised, yellow cap, exact concentrations after reconstitution see labels	2 vials
CONJ	Conjugate, (sheep anti human NT-proBNP-HRPO), red dye, brown cap, ready to use	1 x 22 ml
SUB	Substrate (TMB solution), blue cap, ready to use	1 x 22 ml
STOP	Stop solution, sulphuric acid, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL ADDED TO THE KIT

- 1 self-adhesive plastic film
- QC protocol
- Protocol sheet
- Instruction manual for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 50-500 µl and disposable tips
- ELISA reader for absorbance at 450 nm (630 nm reference optional)
- Graph paper or software for calculation of results
- Plate washer is recommended for washing, alternatively: multichannel pipette or dispenser
- Refrigerator with 4°C (2-8°C)
- Distilled or deionised water

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents as supplied in the kit are stable at 4°C (2-8°C) until the expiry date stated on the label of each reagent.

Sample preparation:

NT-proBNP is stable in whole blood for several hours at room temperature (18-26°C). Nevertheless we recommend separating EDTA plasma or serum by centrifugation as soon as possible, e.g. 20 min at 2,000 x g, preferably at 4°C (2-8°C). EDTA plasma or serum can be stored at 4°C (2-8°C) up to two days. For long term storage, aliquot the acquired samples and store them at -25°C or lower. Samples can be subjected to 3 freeze-thaw cycles. Lipemic or hemolyzed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values. Samples with values above STD5 (640 pmol/l) can be diluted with STD1 or NT-proBNP negative human serum.

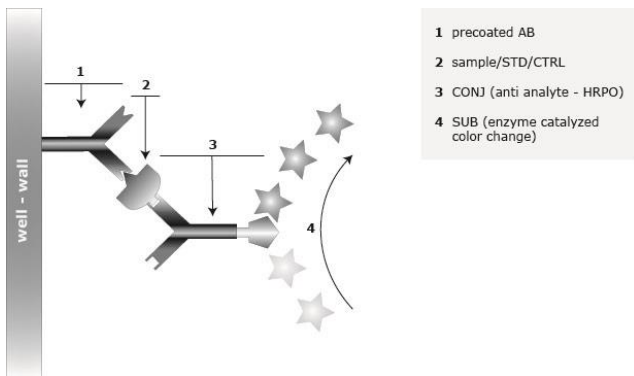
For further information on sample stability and assay performance characteristics please visit our website www.bmgrp.com (s. Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

Reconstitution/Handling:

- **STD (Standard):** Pipette 500 µl of distilled or deionised water into each vial. Leave at room temperature (18-26°C) for 10 min. Swirl gently. The standard concentration is printed on the label. Reconstituted standard is stable at -25°C until expiry date. Avoid freeze-thaw cycles.
- **CTRL (Control):** Pipette 500 µl of distilled or deionised water into each vial. Leave at room temperature (18-26°C) for 10 min. Swirl gently. The final concentration is stated on the label. Reconstituted control is stable at -25°C until expiry date stated on label. Avoid freeze-thaw cycles.
- **WASHBUF (Wash buffer):** Dilute the concentrate 1:20 (e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water). Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature (18-26°C). The undiluted WASHBUF is stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on label. The diluted WASHBUF is stable at 4°C (2-8°C) up to one month. Use only diluted WASHBUF (Wash buffer) for the assay.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

This kit is a sandwich enzyme immunoassay for the determination of NT-proBNP in human serum or EDTA plasma. In a first step, sample and conjugate (sheep anti human NT-proBNP-HRPO) are pipetted into the wells of the microtiter strips, which are pre-coated with polyclonal sheep anti NT-proBNP antibody. NT-proBNP present in the sample binds to the pre-coated antibody in the well and forms a sandwich with the conjugate (detection antibody). In the washing step all non-specific unbound material is removed. In a second step, the substrate (TMB Tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme catalysed colour change of the substrate is directly proportional to the amount of NT-proBNP present in the sample. This colour change is detectable with a standard microtiter plate ELISA reader.



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay.

Mark position for STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) on the protocol sheet.

Take microtiter strips out of the alu bag. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the alu bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

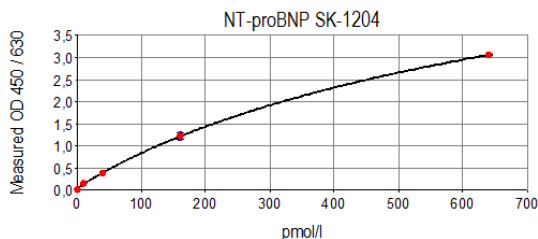
1. Add 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Control) in duplicate into respective well.
2. Add 200 µl CONJ (Conjugate) into each well, swirl gently.
3. **Cover tightly and incubate 3 hours at room temperature (18-26°C).**
4. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel after the last wash.
5. Add 200 µl SUB (Substrate) into each well, swirl gently.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (18-26°C) in the dark.**
7. Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well, swirl gently.
8. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells on a plate reader using 450 nm wavelength (correction wavelength 630 nm). Construct the standard curve from the OD values of the STD. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this standard curve. The assay was evaluated with 4PL algorithm. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user.

Samples with values above STD5 (640 pmol/l) can be diluted with STD1 or NT-proBNP negative human serum and re-assayed. Dilution factors must be considered when calculating the final sample concentrations.

Example typical STD-curve:



The quality control (QC) protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit at production date. Data for OD obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.50 or more is obtained for STD5 and the values of the CTRL are in range (target ranges see labels).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well strips		
Antibodies/Standard:	Capture antibody: polyclonal sheep anti human NT-proBNP antibody, specifically binding to amino acids 31-57 of proBNP. Detection antibody: polyclonal sheep anti human NT-proBNP antibody, conjugated to peroxidase, specifically binding to amino acids 8-29 of proBNP. Standard material: synthetic human NT-proBNP (1-76).		
Sample type:	Human serum, EDTA plasma		
Standard range:	0 to 640 pmol/l (0/10/40/160/640 pmol/l)		
Conversion factor pmol/l to pg/ml	1 pmol/l = 8.475 pg/ml refers to NT-proBNP (1-76) that is detected by the ELISA		
Sample volume:	50 µl / well		
Incubation time:	3 hours / 30 min		
Sensitivity:	LOD (0 pmol/l + 3SD): 3.0 pmol/l; LLOQ: 3.3 pmol/l		
Specificity:	This assay recognizes endogenous (natural) and recombinant human NT-proBNP (1-76).		
Precision:	Intra-assay (n=3) ≤ 4%, Inter-assay (n=8) ≤ 7%		
Spike/Recovery (average R spiked with rec. NT-proBNP)		Spike 80 pmol/l	Spike 320 pmol/l
	Serum (n=4)	99%	108%
	EDTA Plasma (n=4)	94%	93%
Dilution linearity (average R of expected NT-proBNP after a 1+1 dilution)	Serum (rec. NT-proBNP): 117%		Serum (endog. NT-proBNP): 82%
	EDTA plasma (rec. NT-proBNP): 84%		EDTA plasma (endog. NT-proBNP): 84%
Values of apparently healthy individuals:	Median (serum, n=70): 5.8 pmol/l Median (EDTA plasma, n=28): 5.6 pmol/l Each laboratory should establish its own reference data.		

For further information on assay characteristics please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

10) PRECISION

Experiment:

Intra-assay: 2 samples of known concentrations were tested 3 times in 1 assay by 1 operator.

Inter-assay: 2 samples of known concentrations were tested 8 times in 2 assays by different operators.

Intra-assay (n=3)	Sample 1	Sample 2	Inter-assay (n=8)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	60.2	35.2	Mean (pmol/l)	52.1	108.1
SD (pmol/l)	2.0	0.9	SD (pmol/l)	1.7	7.9
CV (%)	4	3	CV (%)	3	7

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or various lots.
- Do not use reagents beyond expiration date. Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colourless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested against HIV-Ab, HCV-Ab and HBsAg, and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious. Liquid reagents contain $\leq 0.1\%$ Proclin 950 as preservative, which is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where reagents are used.
- Avoid all contact with the reagents by using gloves.
- Sulfuric acid is irritating to eyes and skin. Flush with water if contact occurs.

13) LITERATURE

1. Utility of the Amino-Terminal Fragment of Pro Brain Natriuretic Peptide in Plasma. For the Evaluation of Cardiac Dysfunction in elderly Patients in Primary Health Care. Alehagen U et al., Clin Chem, 49:8; 1337-1346 (2003).
2. Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction. Hammerer-Lercher et al., Clin Chim Acta, 310(2),193-197 (2001).
3. Prognostic evaluation of neurohumoral plasma levels before and during beta-blocker therapy in advanced left ventricular dysfunction. Stanek B. et al., JACC, 38, 436-442 (2001).
4. Pulmonary arterial hypertension in rheumatic mitral stenosis: does it affect right ventricular function and outcome after mitral valve replacement? Pande S et al., Interact CardioVasc Thorac Surg, 9: 421-425 (2009).
5. Prognostic impact of body mass index in patients undergoing coronary artery bypass surgery. Sung SH et al., Heart, 97: 648-654 (2011).
6. Effect of piboserod, a 5-HT4 serotonin receptor antagonist, on left ventricular function in patients with symptomatic heart failure. Kjekshus JK et al., Eur J Heart Fail, 11: 771-778 (2009).
7. Plasma pro-B-type natriuretic peptide in the general population: screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction. Goetze JP et al., Eur Heart J, 27: 3004-3010 (2006).

1) EINLEITUNG

BNP wird hauptsächlich durch Myokard als Reaktion auf Volumenüberladung und erhöhtem Fülldruck synthetisiert. Reifes BNP besteht nach Verlust der Signalsequenz aus 108 Aminosäuren (proBNP oder BNP-108). Es wird in das physiologisch aktive BNP-32, weitere C-terminale Fragmente (vgl. http://www.uniprot.org/uniprot/P16860#PRO_0000001532), sowie ein physiologisch inaktives N-terminales Peptid aus Aminosäuren 1-76 gespalten, das weiter proteolytisch abgebaut wird. Die BNP-Fragmente in der Zirkulation sind daher sehr heterogen.

BNP spielt eine Schlüsselrolle in der kardiovaskulären Homöostase mit biologischen Wirkungen einschließlich Natriuresis, Diurese, Vasorelaxation, und der Hemmung von Renin und Aldosteron-Sekretion. Eine hohe Konzentration von BNP im Blut ist ein Hinweis auf Herzinsuffizienz.

Interessensgebiete:

- Herzinsuffizienz, akuter Myokardinfarkt (linksventrikuläre Dysfunktion)
- Niereninsuffizienz
- Adipositas und Diabetes
- Verschiedene Formen der sekundären Hypertonie
- Therapiebeobachtung von Patienten mit Herzinsuffizienz

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Polyklonaler Schaf anti NT-proBNP Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Aluminium Beutel mit Trockenmittel	12 x 8 Teste
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtiger Verschluss	1 x 50 ml
STD	Standard, synthetisches humanes NT-proBNP (0, 10, 40, 160, 640 pmol/l), weißer Verschluss, lyophilisiert,	5 Fläschchen
CTRL	Kontrollen, synthetisches humanes NT-proBNP, gelber Verschluss, lyophilisiert, genaue Konzentrationen nach Rekonstitution siehe Etiketten	2 Fläschchen
CONJ	Konjugat (Schaf anti human NT-proBNP-HRPO), rot gefärbt, brauner Verschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), blauer Verschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STOP	Stopp Lösung, H ₂ SO ₄ , weißer Verschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- QC Protokoll
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 50-500 µl inkl. Pipettenspitzen
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz optional)
- Millimeterpapier oder Software
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Kühlschrank mit 4°C (2-8°C)
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) stabil.

Probenvorbereitung:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Serum oder Plasma. NT-proBNP ist im Vollblut für einige Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) stabil. Trotzdem wird die Zentrifugation des Blutes für 20 Minuten bei 2000 g, bevorzugt bei 4°C (2-8°C), so schnell wie möglich empfohlen. Serum oder EDTA-Plasma kann bis zu 2 Tage bei 4°C (2-8°C) aufbewahrt werden. Für Langzeit Lagerung sollen die Proben aliquotiert und bei -25°C

oder tiefer gelagert werden. Bis zu 3 Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmung für alle Werte. Proben mit Werten über STD5 (640 pmol/l) können mit STD1 oder NT-proBNP negativem human Serum verdünnt werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website www.bmgrp.com (s. Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an info@bmgrp.com oder Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

Rekonstitution/Handhabung:

- **STD (Standard):** Pipettieren Sie 500 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser in jeden Standard. Lassen Sie das Lyophilisat bei Raumtemperatur (18-26°C) 10 Minuten lösen. Gut mischen. Genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett. Der rekonstituierte Standard ist bei -25°C oder niedriger bis zum Ablaufdatum haltbar. Vermeiden Sie Frier/Tau Zyklen.
- **CTRL (Kontrolle):** Pipettieren Sie 500 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser in die Kontrolle. Lassen Sie das Lyophilisat bei Raumtemperatur (18-26°C) 10 Minuten lösen. Gut mischen. Genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett. Der rekonstituierte Kontrolle ist bei -25°C oder niedriger bis zum Ablaufdatum haltbar. Vermeiden Sie Frier/Tau Zyklen.
- **WASHBUF (Waschpuffer):** Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 (1+19) verdünnt, zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser. Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur auf. Der unverdünnte WASHBUF ist bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum haltbar. Der verdünnte WASHBUF ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF verwendet werden.

6) TESTPRINZIP

Siehe Kapitel 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* im englischen Teil des Beipacktextes.

7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen.

Markieren Sie die Positionen für STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) am Protokollblatt.

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminium Beutel. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Aluminium Beutel bei 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

1. Pipettieren Sie 50 µl STD/PROBE/CTRL (Standards/Sample/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die entsprechenden Wells.

2. Pipettieren Sie 200 µl CONJ (Konjugat) in alle Wells. Gut mischen.

3. Streifen abdecken und 3 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren.

4. Inhalt der Wells werfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.

5. Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat) in alle Wells. Gut mischen.

6. 30 min bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.

7. Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells. Gut mischen.

8. Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die optische Dichte (OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450 nm Filter (Referenz 630 nm). Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde mit einem 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Proben mit Ergebnissen über dem höchsten Standard (STD5, 640 pmol/l) können mit STD1 oder niedrig messendem Serum verdünnt und erneut getestet werden. Eventuelle weitere Verdünnungen müssen bei der Berechnung der Probenwerte berücksichtigt werden.

Typische STD-Kurve:

Siehe Kapitel 8) *CALCULATION OF RESULTS* im englischen Teil des Beipacktextes.

Auf dem beige packten QC Protokoll sind die Resultate der QC Freigabe der jeweiligen Kit Lot vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD von STD5 den Wert 1,50 oder höher erreicht und die Werte der CTRL im gültigen Bereich ist

(Bereiche siehe Etiketten).

9) TESTMERKMALE

Methode:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well Streifen		
Antibodies/Standard:	Beschichtungsantikörper: polyklonal Schaf anti human NT-proBNP (aa 31-57) Detektionsantikörper: polyklonal Schaf anti human NT-proBNP (aa 8-29), HRPO konjugiert. Standard material: synthetisches human NT-proBNP (1-76).		
Probentyp:	Human serum, EDTA plasma		
Standardbereich:	0 bis 640 pmol/l (0, 10, 40, 160, 640)		
Umrechnungsfaktor pg/ml zu pmol/l:	1 pmol/l = 8,475 pg/ml Bezugnehmend auf NT-proBNP (1-76) Standardmaterial		
Probenvolumen:	50 µl / well		
Inkubationszeiten:	3 h / 30 min		
Sensitivität:	LOD (0pmol/l + 3SD): 3,0 pmol/l; LLOQ: 3,3 pmol/l		
Spezifität	Dieser Assay erkennt endogens und rekombinantes humanes NT-proBNP (1-76).		
Präzision:	Intra-assay (n=3) ≤ 4% , Inter-assay (n=8) ≤ 7%		
Wiederfindung (durchschnittliche R nach spike mit rek. NT-proBNP)		Spike 80 pmol/l	Spike 320 pmol/l
	Serum (n=4)	99%	108%
	EDTA Plasma (n=4)	94%	93%
Verdünnungslinearität (durchschnittliche NT-proBNP Werte nach 1+1 VD)	Serum (rek. NT-proBNP): 117%		Serum (endog. NT-proBNP): 82%
	EDTA plasma (rek. NT-proBNP): 84%		EDTA plasma (endog. NT-proBNP): 84%
Werte von anscheinend gesunden Spendern:	Median (Serum, n=70): 5,8 pmol/l Median (EDTA plasma, n=28): 5,6 pmol/l Jedes Labor sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren. Wechseln Sie nicht die Probenmatrix innerhalb einer Studie.		

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (s. Validation Data) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an info@bmgrp.com oder telefonisch unter +43/ 1/ 29107-45.

10) PRÄZISION

Experiment:

Intra-assay: 2 Proben wurden 3 Mal in Doppelbestimmung in 1 Test von 1 Operator getestet.

Inter-assay: 2 Proben wurden 8 Mal in Doppelbestimmung in 2 Tests von unterschiedlichen Operatoren getestet.

Intra-assay (n=3)	Probe 1	Probe 2	Inter-assay (n=8)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	60,2	35,2	Durchschnitt (pmol/l)	52,1	108,1
SD (pmol/l)	2,0	0,9	SD (pmol/l)	1,7	7,9
VK (%)	4	3	VK (%)	3	7

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel und Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden. Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden auf HIV-Ak, HCV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Die flüssigen Reagenzien enthalten $\leq 0,1\%$ Proclin 950 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 950 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe, Schutzbrille und Laborkleidung während der Testdurchführung.
- Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) *LITERATURE* im englischen Teil des Beipacktextes.

1) INTRODUCTION

BNP est principalement exprimé par le myocarde ventriculaire en réponse à la surcharge de volume et augmentation de la pression de remplissage. BNP possède une séquence signal clivable.

BNP mature est constituée de 108 acides aminés (proBNP ou BNP-108), et subit un clivage résultant de l'activité physiologique de BNP-32 et des fragments supplémentaires C-terminaux (cf. http://www.uniprot.org/uniprot/P16860#PRO_0000001532), et aussi d'un peptide N-terminal physiologiquement inactif comprenant les acides aminés 1 à 76, qui est ensuite dégradé par protéolyse. BNP a un rôle clé dans l'homéostasie cardiovasculaire avec des actions biologiques, y compris la natriurèse, la diurèse, vasorelaxation, et l'inhibition de la rénine et la sécrétion d'aldostérone. Une forte concentration de BNP dans le sang est indicatif d'une insuffisance cardiaque.

Domaines d'intérêts:

- Insuffisance cardiaque, infarctus aigu du myocarde (dysfonctionnement ventricule gauche)
- Insuffisance rénale
- L'obésité et le diabète
- Différentes formes d'hypertensions secondaires
- Le suivi de la thérapie de patients souffrant d'insuffisance cardiaque

2) CONTENU DU KIT

CONTENU	COMPOSANTS DU KIT	QUANTITÉ
PLATE	Plaques de barrettes de microtitration revêtues d'anticorps anti-NT-proBNP (31-57), avec support pour barrettes. Conditionnées en sachets alu avec dessicatif.	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampon de lavage, concentré 20x, bouchon transparent	1 x 50 ml
STD	Standard (MST): NT-proBNP humaine synthétique (0, 10, 40, 160, 640 pmol/l), lyophilisées, bouchon blancs	5 flacons
CTRL	Contrôles: NT-proBNP humaine synthétique, lyophilisée, bouchon jaune, voir la concentrations exacte après reconstitution sur l'étiquettes	2 flacons
CONJ	Conjugué: anticorps de mouton anti-NT-proBNP (8-29)-HRPO humaine, colorant rouge, bouchon brun, prêt à l'emploi	1 x 22 ml
SUB	Substrat: solution de TMB, bouchon bleu, prête à l'emploi	1 x 22 ml
STOP	Solution d'acide sulfurique, bouchon blanc, prête à l'emploi	1 x 7 ml

3) MATERIEL ADDITIONNEL CONTENU DANS LE KIT

- 1 bande de film adhésif
- Protocole de contrôle qualité
- Feuille de protocole
- Mode d'emploi

4) MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT REQUIS

- Pipettes de précision étalonnées pour délivrer 50-500 µl et embouts jetables
- Un lecteur de plaque ELISA absorbance à 450 nm (référence 630 nm)
- Papier millimétré ou logiciel pour le calcul des résultats
- Un laveur de plaques est conseillé, alternatives: pipette multicanaux, distributeurs
- Réfrigérateur à 4°C (2-8°C)
- Eau distillée ou désionisée

5) REACTIFS ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Tous les réactifs du kit sont stables à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de chaque flacon.

Préparation de l'échantillon:

Recueillir du sang veineux dans un tube de prélèvement de sang standard pour sérum ou plasma. NT-proBNP est stable dans le sang entier pendant plusieurs heures à température ambiante (18-26°C). Néanmoins, nous recommandons de centrifuger le sang immédiatement, par ex. pendant 20 minutes à 2000 x g à 4°C (2-8°C).

Le sérum ou le plasma obtenu doivent être mesurés le plus tôt possible. Le sérum ou le plasma peut être stockés à 4°C (2-8°C) jusqu'à deux jours. À des fins de conservation, les échantillons doivent être fractionnés et conservés à une température égale ou inférieure à -25°C. Les échantillons peuvent être soumis à 3 cycles de congélation-décongélation sans perte de réactivité immunitaire. Les échantillons lipémiques ou hémolysés peuvent donner des résultats erronés. Les échantillons doivent être mélangés avant le dosage.

Nous recommandons l'utilisation de doublons pour toutes les valeurs. Les échantillons avec des teneurs supérieures de STD5 (640 pmol/l) peuvent être dilués avec la solution de STD1 ou le sérum NT-proBNP humain négatif. Pour de plus amples informations sur les caractéristiques de performance, de stabilité et d'analyse de l'échantillon merci de visiter notre site Web www.bmgrp.com (v Validation Data) ou de contacter notre service client par e-mail info@bmgrp.com ou par téléphone +43 / 1 / 29107-45.

Reconstitution / manutention :

- **STD (MST, Standard):** Insérer à l'aide d'une pipette 500 µl d'eau distillée ou désionisée dans chaque flacon. Laisser à température ambiante (18-26°C) pendant 10 min. Agiter doucement. La concentration finale est indiquée sur l'étiquette. Le standard reconstitué est stable à -25°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Éviter les cycles de congélation-décongélation.
- **CTRL (Control):** Insérer à l'aide d'une pipette 500 µl d'eau distillée ou désionisée dans chaque flacon. Laisser à température ambiante (18-26°C) pendant 10 min. Agiter doucement. Les concentrations finale sont indiquée sur l'étiquettes. Le contrôle reconstitué est stable à -25°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Éviter les cycles de congélation-décongélation.
- **WASHBUF (Tampon de lavage):** Diluer le concentré au 1:20 (1+19), par exemple 50 ml de WASHBUF + 950 ml d'eau distillée ou désionisée. Les cristaux dans le concentré de tampon vont se dissoudre à température ambiante (18-26°C). Le tampon concentré reste stable à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette. Le tampon dilué reste stable à 4°C (2-8°C) jusqu'à un mois. Utilisez uniquement cette solution de tampon de lavage diluée (WASHBUF) pour le dosage.

6) PRINCIPE DE L'ESSAI

Voir au chapitre 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* de la version anglaise de la notice d'utilisation.

7) ASSAY PROTOCOL

Tous les réactifs et les échantillons doivent être à température ambiante (18-26°C) avant utilisation dans le dosage. Marquer les positions du STD/Échantillon/CTRL (Étalon/Échantillon/Contrôle) sur la feuille de protocole. Sortir les barrettes de microtitration du sachet alu. Les barrettes inutilisées peuvent être conservées dans le sachet alu avec le dessiccatif à une température de 4°C (2-8°C). Les barrettes restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

- | |
|---|
| 1. Distribuer 50 µl de STD/ Échantillon/CTRL (Étalon/Échantillon/Contrôle) en double dans leurs puits respectifs. |
| 2. Ajouter 200 µl de CONJ (conjugué, bouchon brun) dans chaque puit, agiter doucement. |
| 3. Couvrir hermétiquement la plaque et laisser incubé 3 heures à température ambiante (18-26°C). |
| 4. Aspirer et laver 5 fois les puits avec 300 µl de solution de tampon de lavage diluée (WASHBUF), retirez le reste de solution WASHBUF en tapant fortement la plaque contre une serviette en papier après le dernier lavage. |
| 5. Ajouter 200 µl de SUB (Substrat, bouchon bleu) dans chaque puit, agiter doucement. |
| 6. Incuber pendant 30 min à température ambiante (18-26°C) dans le noir. |
| 7. Ajouter 50 µl de STOP (Solution stop, bouchon blanc) dans chaque puit, agiter doucement. |
| 8. Mesurer l'absorbance immédiatement à 450 nm avec une référence 630 nm, si possible. |

8) CALCUL DES RESULTATS

Mesurer la densité optique (DO) de chaque puits avec un photomètre pour microplaques à filtre de 450 nm (référence 630 nm). Construire la courbe d'étalonnage à partir des valeurs de DO des étalons. Utiliser un logiciel prévu à cet effet ou du papier millimétré vendu couramment dans le commerce. Obtenir la concentration des échantillons à partir de cette courbe d'étalonnage. Le système de dosage a été évalué avec logit-log et un algorithme d'ajustement à 4 paramètres 4PL. Différents algorithmes d'ajustement doivent être évalués par l'utilisateur. Les échantillons qui donnent les valeurs plus élevées que le dernier standard (STD5, 640 pmol/l) doivent être dilués avec STD1 ou un sérum négatif en NT-proBNP. Les facteurs de dilution respectifs doivent être pris en compte dans le calcul de la concentration finale de l'échantillon.

Exemple de courbe de standard typique:

Voir au chapitre 8) *CALCULATION OF RESULTS* dans la version anglaise de la notice d'utilisation.

Le protocole de contrôle de qualité (QC) fourni avec le kit présente les résultats de la version finale de QC pour chaque kit à la date de production. Les données de densité optique obtenues par les clients peuvent différer en raison de diverses influences et/ou en raison de la diminution normale de l'intensité du signal pendant la durée de vie. Toutefois, cela n'affecte pas la validité des résultats tant qu'une DO ≥ 1.50 est obtenue pour STD5 et que les valeurs du CTRL sont dans la plage (pour la plage cible, voir l'étiquette).

9) CARACTÉRISTIQUES DE L'ESSAI

Méthode:	ELISA sandwich, HRP/TMB, barrettes de 12x8 puits		
Type d'échantillon:	Sérum, plasma EDTA		
Gamme d'étalonnage:	0 à 640 pmol/l (0, 10, 40, 160, 640)		
Facteur de conversion:	1 pmol/l = 8,475 pg/ml en référence à NT-proBNP (1-76)		
Volume d'échantillon:	50 μ l / puits		
Temps d'incubation:	3 h / 30 min		
Sensibilité:	LOD (0pmol/l + 3SD): 3,0 pmol/l; LLOQ: 3,3 pmol/l		
Spécificité:	Ce dosage reconnaît le NT-proBNP (1-76) humain endogène et recombinant.		
Précision:	Intra-série (n=3) \leq 4% , Inter-séries (n=8) \leq 7%		
Dopage/Récupération (récupération moyenne avec rec. NT-proBNP)		Spike 80 pmol/l	Spike 320 pmol/l
	Serum (n=4)	99%	108%
	EDTA Plasma (n=4)	94%	93%
Linéarité de la dilution (récupération moyenne de NT- proBNP attendu après une dilution 1+1)	Serum (rec. NT-proBNP): 117%		Serum (endog. NT-proBNP): 82%
	EDTA plasma (rec. NT-proBNP): 84%		EDTA plasma (endog. NT-proBNP): 84%
Valeurs d'individus apparemment en bonne santé:	Valeur médiane (serum, n=70): 5,8 pmol/l Valeur médiane (EDTA plasma, n=28): 5,6 pmol/l Chaque laboratoire doit établir sa propre gamme de référence pour les échantillons en cours d'évaluation. Ne pas modifier le type d'échantillon pendant l'étude.		

Pour plus d'informations sur les caractéristiques du dosage, veuillez vous rendre sur notre site web à l'adresse www.bmgrp.com (voir Validation Data) ou contacter notre service client par courriel à l'adresse info@bmgrp.com ou par téléphone au +43/ 1/ 29107-45.

10) PRÉCISION

Expérience:

Intra-série: 2 échantillons de concentration connues ont été testés 3 fois dans 1 analyse par 1 opérateur.

Inter-séries: 2 échantillons de concentrations connues ont été testés 8 fois dans 2 essais par différents opérateurs.

Intra-série (n=3)	Échantillon 1	Échantillon 2	Inter-séries (n=8)	Échantillon 1	Échantillon 2
Moyenne (pmol/l)	60.2	35.2	Moyenne (pmol/l)	52.1	108.1
SD (pmol/l)	2.0	0.9	SD (pmol/l)	1.7	7.9
CV (%)	4	3	CV (%)	3	7

11) CONSEILS TECHNIQUES

- Ne pas mélanger ou échanger les réactifs d'autres lots ou sources.
- Ne pas mélanger les bouchons et capsules des différents réactifs ou entre plusieurs lots.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration. Protéger les réactifs de la lumière du soleil.
- La solution de substrat doit rester incolore jusqu'à son ajout dans la plaque.
- Pour garantir des résultats précis, il est nécessaire de bien sceller les plaques pendant les étapes d'incubation.

12) PRECAUTIONS

Tous les composants de test de source humaine ont été testés contre le VIH-Ab, VCH-Ab et l'AgHBs et ont été trouvés négatifs.

Néanmoins, ils doivent être manipulés et éliminés comme étant susceptibles de transmettre des maladies infectieuses. Tous les réactifs liquides contiennent $\leq 0,1\%$ de Proclin 950 comme conservateur. Le Proclin 950 n'est pas toxique aux concentrations utilisées dans cette trousse. Il peut toutefois provoquer des réactions cutanées allergiques – éviter tout contact avec la peau et les yeux.

- Ne pas pipetter à la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer de cosmétiques dans le laboratoire où les réactifs sont utilisés.
- Éviter tout contact avec les réactifs en utilisant des gants.
- L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. Irritations possibles. Rincer abondamment avec de l'eau en cas de contact.

13) LITERATURE

Voir au chapitre 13) *LITERATURE* dans la version anglaise de la notice d'utilisation.

1) INTRODUZIONE

Il BNP è principalmente espresso dal miocardio ventricolare in risposta a sovraccarico di volume ed aumento della pressione di riempimento. Il BNP ha una sequenza segnale sfaldabile. Il BNP maturo consiste di 108 amminoacidi (proBNP o BNP-108), e subisce una segmentazione risultante in BNP-32 fisiologicamente attivo e altri frammenti C-terminali (cf. http://www.uniprot.org/uniprot/P16860#PRO_000001532), assieme ad un peptide N-terminale fisiologicamente non attivo, comprendente gli amminoacidi 1-76, che viene ulteriormente degradato proteoliticamente.

Il BNP ha un ruolo chiave nell'omeostasi cardiovascolare con azioni biologiche che comprendono natriuresi, diuresi, vasodilatazione e inibizione della secrezione di renina e aldosterone. Un'elevata concentrazione di BNP nel sangue è indicativa di insufficienza cardiaca.

Arete di Interesse

- Insufficienza cardiaca, infarto miocardico acuto, (disfunzione ventricolare)
- Insufficienza renale
- Obesità e diabete
- Varie forme di ipertensioni secondarie
- Monitoraggio della terapia sui pazienti con scompenso cardiaco

2) CONTENUTO DEL KIT

CONT	COMPONENTI DEL KIT	QUANTITA'
PLATE	Strisce di microtitolazione sensibilizzate con anticorpo policlonale di pecora anti NT-proBNP (31-57), confezionate in busta di alluminio con dessiccante	12 x 8 test
WASHBUF	Tampone di lavaggio, concentrato 20x, tappo trasparente	1 x 50 ml
STD	Standard (calibrazione) di NT-proBNP sintetico umano (0, 10, 40, 160, 640 pmol/l), liofilo, tappi bianchi	5 flaconi
CTRL	Controllo di NT-proBNP sintetico umano, liofilo, tappo giallo, vedere l'etichetta per l'esatta concentrazione dopo ricostituzione	2 flaconi
CONJ	Coniugato, (anti human NT-proBNP (8-29)-HRPO di pecora), colore rosso, tappo marrone, pronto per l'uso	1 x 22 ml
SUB	Substrato (soluzione di TMB), tappo blu, pronto per l'uso	1 x 22 ml
STOP	Soluzione di stop, acido solforico, tappo bianco, pronto per l'uso	1 x 7 ml

3) ALTRO MATERIALE AGGIUNTO AL KIT

- 1 pellicola di plastica auto-adesiva
- Foglio del QC
- Schema del protocollo
- Manuale d'istruzioni d'uso

4) MATERIALE ED EQUIPAGGIAMENTO RICHIESTI MA NON FORNITI

- Micropipette calibrate per 50-500 µl e puntali monouso
- Lettore ELISA dotato di filtro a 450 nm (riferimento da 630 nm)
- Carta millimetrata oppure software per il calcolo dei risultati
- Lavatore di micropiastre (consigliato) o, in alternativa, pipetta multicanale o dispensatore
- Frigorifero a 4°C (2-8°C)
- Acqua distillata o deionizzata

5) PREPARAZIONE DEI REAGENTI E DEI CAMPIONI

Tutti i reagenti così come forniti kit sono stabili a 4°C (2-8°C) fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta di ciascun flacone.

Preparazione del campione:

Prelevare i campioni di sangue venoso utilizzando provette standard per siero o plasma. L'NT-proBNP è stabile nel sangue intero per diverse ore a temperatura ambiente (18-26°C). Tuttavia, Si consiglia di separare il siero o il EDTA plasma dalla parte corpuscolata centrifugando prima possibile i campioni, es. 20 min. a 2000 x g, preferibilmente a 4°C (2-8°C). Il siero o il EDTA plasma possono essere conservati a 4°C (2-8°C) fino a due giorni. Per la conservazione per periodi di tempo più lunghi, aliquotare i campioni di siero o di EDTA plasma e conservarli a -25°C o a temperature inferiori. I campioni possono essere sottoposti a 3 cicli di congelamento-scongelo senza alcuna perdita di reattività immunitaria. I campioni

lipemici o emolizzati possono dare risultati errati. Mescolare bene i campioni prima di dosarli. Si raccomanda di misurare ciascun campione in duplicato. Diluire con STD1 o siero umano negativo per NT-proBNP i campioni con concentrazione superiore allo STD5 (640 pmol/l).

Per ulteriori informazioni sulla stabilità dei campioni e le caratteristiche prestazionali di questo kit, si prega di visitare il nostro sito web www.bmgrp.com (v Validation Data) o contattare il nostro servizio clienti per e-mail info@bmgrp.com o telefonicamente al numero +43/ 1/ 29107-45, oppure contattare il distributore locale.

Ricostituzione/Manipolazione:

- **STD (Standard):** Pipettare 500 µl di acqua distillata o deionizzata dentro ciascun flacone. Lasciare a temperatura ambiente (18-26°C) per 10 min. Agitare delicatamente. La concentrazione di ciascuno standard è stampata sull'etichetta del corrispondente flacone. Gli standard ricostituiti sono stabili a -25°C fino alla data di scadenza. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.
- **CTRL (Controllo):** Pipettare 500 µl di acqua distillata o deionizzata dentro ciascun flacone. Lasciare a temperatura ambiente (18-26°C) per 10 min. Agitare delicatamente. La concentrazione finale è riportata sull'etichetta del flacone. Il controllo ricostituito è stabile a -25°C fino alla data di scadenza dichiarata sull'etichetta. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.
- **WASHBUF (Tampone di lavaggio):** Diluire il tampone concentrato 1:20 (1+19), es. 50 ml di WASHBUF + 950 ml di acqua distillata. I cristalli eventualmente presenti nel tampone concentrato si discioglieranno a temperatura ambiente (18-26°C). Il tampone concentrato è stabile a 4°C (2-8°C) fino alla data riportata sull'etichetta di flacone. Il tampone diluito è stabile a 4°C (2-8°C) per un mese. Usare solo WASHBUF diluito (Tampone di lavaggio) per il dosaggio.

6) PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Vedere capitolo 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* delle istruzioni d'uso in Inglese.

7) PROTOCOLLO DI DOSAGGIO

Portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (18-26°C) prima di iniziare il dosaggio.

Contrassegnare la posizione per il STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Campione/Controllo) sullo schema del protocollo.

Prendere le strisce di microtitolazione dalla busta di alluminio. Conservare dentro la busta di alluminio le strisce non utilizzate con il desiccante a 4°C (2-8°C). Le strisce sono stabili fino alla data di scadenza dichiarata sull'etichetta.

1. Aggiungere 50 µl di STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Campione/Controllo) in duplicato nei pozzetti corrispondenti.
2. Aggiungere 200 µl di CONJ (Coniugato) in tutti i pozzetti, agitare delicatamente.
3. **Coprire bene e incubare per 3 ore a temperatura ambiente (18-26°C).**
4. Aspirare e lavare i pozzetti 5x con 300 µl di WASHBUF diluito (Tampone di lavaggio), rimuovere il WASHBUF restante picchiando la piastra su un tovagliolo di carta dopo l'ultimo lavaggio.
5. Aggiungere 200 µl di SUB (Substrato) in tutti i pozzetti, agitare delicatamente.
6. **Incubare per 30 min a temperatura ambiente (18-26°C) al buio.**
7. Aggiungere 50 µl di STOP (Soluzione di stop) in tutti i pozzetti, agitare delicatamente.
8. Misurare subito l'assorbanza a 450 nm con riferimento a 630 nm, se disponibile.

8) CALCOLO DEI RISULTATI

Leggere la densità ottica (OD) di tutti i pozzetti su un lettore di micropiastre utilizzando la lunghezza d'onda di 450 nm (lunghezza d'onda di correzione di 630 nm). Costruire la curva di calibrazione dai valori OD degli STD. Usare un software disponibile in commercio o della carta millimetrata. Ricavare la concentrazione del campione da questa curva di calibrazione. Questo dosaggio è stato valutato utilizzando l'algoritmo 4PL. Metodi di calcolo differenti che utilizzano altri algoritmi devono essere valutati dall'utilizzatore. I campioni con risultato superiore allo standard a concentrazione più elevate (STD5, 640 pmol/l) devono essere diluiti con STD1 o un siero a bassa concentrazione di analita e ridosati. Considerare i fattori di diluizione utilizzati per il calcolo della concentrazione di questi campioni.

Esempio di curva STD tipica:

Vedere capitolo 8) *CALCULATION OF RESULTS* delle istruzioni d'uso in Inglese.

Il foglio del controllo di qualità (QC) fornito con il kit mostra i risultati al rilascio QC finale per tutti i kit alla data di produzione. Le OD ottenute dai clienti possono essere differenti per varie influenze e/o a causa del normale decremento di intensità del segnale durante la validità del kit. Tuttavia, ciò non influisce sulla validità dei risultati finché si ottiene una OD di

1.50 o superiore per lo STD a concentrazione più elevata e finché il valore del CTRL è compreso nell'intervallo di riferimento (vedere l'etichetta).

9) CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Metodo:	ELISA tipo Sandwich, HRP/TMB, 12x8 strisce di pozzetti		
Tipo di campione:	Siero, plasma-EDTA		
Intervallo degli standard:	Da 0 a 640 pmol/l (0, 10, 40, 160, 640)		
Fattore di conversione:	1 pmol/l = 8,475 pg/ml, riguardo a NT-proBNP (1-76)		
Volume di campione:	50 µl / pozzetto		
Tempo di incubazione:	3 h / 30 min		
Sensibilità:	LOD (0pmol/l + 3SD): 3,0 pmol/l; LLOQ: 3,3 pmol/l		
Specificità:	Questo test riconosce NT-proBNP (1-76) endogeno e ricombinante umano.		
Precisione:	Intra-saggio (n=3) ≤ 4%, Inter-saggio (n=8) ≤ 7%		
Recupero (media del recupero dopo aggiunta di NT-proBNP ric.)		Spike 80 pmol/l	Spike 320 pmol/l
	Serum (n=4)	99%	108%
	EDTA Plasma (n=4)	94%	93%
Linearità della diluizione (media del recupero della NT-proBNP attesa dopo diluizione 1+1)	Serum (ric. NT-proBNP): 117%		Serum (endog. NT-proBNP): 82%
	EDTA plasma (ric. NT-proBNP): 84%		EDTA plasma (endog. NT-proBNP): 84%
Valori attesi per gli individui apparentemente sani:	Mediana (serum, n=70): 5,8 pmol/l Mediana (EDTA plasma, n=28): 5,6 pmol/l Ciascun laboratorio dovrebbe stabilire dei propri intervalli di riferimento a seconda dei campioni esaminati. Non cambiare tipo di campione durante lo studio dei valori attesi.		

Per ulteriori informazioni sulla caratteristiche del dosaggio si prega di visitare il sito web www.bmgrp.com (vedi Validation Data) o il distributore autorizzato locale.

10) PRECISIONE

Esperimento:

Intra-saggio: 2 campioni a concentrazione nota sono stati misurati 3 volte in 1 saggio da 1 operatore.

Inter-saggio: 2 campioni a concentrazione nota sono stati misurati 8 volte in 2 saggi da operatori differenti.

Intra-saggio (n=3)	Campione 1	Campione 2	Inter-saggio (n=8)	Campione 1	Campione 2
Media (pmol/l)	60.2	35.2	Media (pmol/l)	52.1	108.1
SD (pmol/l)	2.0	0.9	SD (pmol/l)	1.7	7.9
CV (%)	4	3	CV (%)	3	7

11) NOTE TECNICHE

- Non mescolare o sostituire i reagenti con quelli di altri lotti o altra provenienza.
- Non scambiare i tappi di differenti reagenti o tra i vari lotti.
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza. Proteggere i reagenti dalla luce solare diretta.
- La soluzione di substrato deve restare incolore fino alla sua aggiunta in micropiastra.
- Per assicurare l'ottenimento di risultati accurati, è necessario che la pellicola autoadesiva sia ben sistemata sui pozzetti della micropiastra durante le incubazioni.

12) PRECAUZIONI

Tutti i componenti del kit di origine umana sono stati misurati contro HIV-Ab, HCV-Ab e HbsAg, e sono risultati negativi. Tuttavia, tali componenti devono essere manipolati e smaltiti come potenziali materiali infettivi. I reagenti liquidi contengono Proclin 950 $\leq 0.1\%$ come conservante, il quale non è tossico alle concentrazioni usate in questo kit. Potrebbe causare reazioni allergiche alla cute – evitare il contatto con la cute o gli occhi.

- Non pipettare a bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o usare cosmetici nei luoghi ove vengono utilizzati i reagenti.
- Evitare ogni contatto con i reagenti utilizzando i guanti.
- L'acido solforico è irritante per gli occhi e la cute. Sciacquare bene con acqua in caso di contatto.

13) BIBLIOGRAFIA

Vedere capitolo 13) *LITERATURE* delle istruzioni d'uso in Inglese.

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use) / In vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik) / Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro) / Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro) / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (Para utilização de diagnóstico "in vitro") / Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (Voor diagnostisch gebruik in vitro) / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse) / Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (För in vitro-diagnostiskt bruk) / Wyrób medyczny do Diagnostyki In Vitro / In vitro orvosdiagnosztikai termék / In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určené pre diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Número di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalógové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujcie w rozsahu / Skladujcie w rozmezi



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenuto sufficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Ineholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

SK-1204 NT-proBNP

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- Bring all reagents to room temperature (18-26°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- Take microtiter strips out of the alu bag and mark positions on the protocol sheet.

TEST PROCEDURE:

- Step 1) Add 50 µl STD/ SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) in duplicate into respective well.
- Step 2) Add 200 µl CONJ (Conjugate) into each well. Swirl gently.
- Step 3) Cover tightly and incubate for 3 hours at room temperature (18-26°C).**
- Step 4) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). Remove remaining buffer by strongly tapping plate against paper towel after last wash.
- Step 5) Add 200 µl SUB (Substrate) into each well. Swirl gently.
- Step 6) Incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Step 7) Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well. Swirl gently.
- Step 8) Read Optical Density at 450 nm with reference 630 nm, if available.