

NT-proCNP

(EN) ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF HUMAN
NT-proCNP IN PLASMA AND SERUM
CAT. NO. BI-20872 12 X 8 TESTS

(DE) ENZYM IMMUNOASSAY FÜR DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON HUMAN
NT-proCNP IN PLASMA UND SERUM
KAT. NR. BI-20872 12 X 8 TESTE

(FR) DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUANTITATIVE DU
NT-proCNP HUMAIN DANS LE PLASMA OU LE SERUM
REF: BI-20872 12 X 8 TESTS

rev.no. 110331 (replacing 100825)

Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 85, E-mail export@bmgrp.at

CONTENT / INHALT / SOMMAIRE / CONTENUTO / CONTENIDO

- 1) ENGLISH 3
- 2) DEUTSCH 7
- 3) FRANÇAIS .. 11

Additional information on our products is available on our website.

Zusätzliche Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer Webseite.

Pour toute information complémentaire sur nos produits, visiter notre site Internet.

Ulteriori informazioni sui nostri prodotti possono essere cercate sulla nostra home page.

Encontrará información adicional sobre nuestros productos en nuestra página web.

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

CNP belongs to a well characterised group of natriuretic peptides like atrial natriuretic (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP), which play various important roles as regulatory mechanisms as well as bio-markers. They participate in the regulation of blood pressure and body fluid homeostasis, modify growth and development of cardiovascular tissues and bone. ANP and BNP are cardiac hormones, secreted by the atria and ventricles, respectively, in the normal adult heart. In contrast to ANP and BNP, very little CNP is produced by cardiac tissue, but is expressed primarily in the brain, pituitary gland, vascular endothelium, kidney and female reproductive tract.

All natriuretic peptides are produced as propeptides, which are subsequently cleaved into the biologically active, C-terminal hormone and the N-terminal fragment (NT-proANP 1-98, NT-proBNP 1-76 and NT-proCNP, which length is still under discussion). Since those N-terminal fragments are much more stable, and circulate in higher amounts than the active hormones, they are easier and more reliable to be measured in serum or plasma. So we developed a sandwich immunoassay for NT-proCNP using antibodies directed against amino acids 1-19 and 30-50. The physiological role of CNP is not only studied in cardiac disease, but also in bone developmental biology, generally in bone research, renal diseases, embryonic developmental research and vascular diseases.

Indications:

- vascular disease
- diabetes
- skeletal development
- sepsis

2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Polyclonal sheep anti NT-proCNP antibody precoated microtiter strips in stripholder packed in alu bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay buffer, red cap, ready to use	1 x 10 ml
STD	Standards, (0; 2.5; 5; 10; 20; 40 pmol/l), white caps, ready to use	6 x 500 µl
CTRL	Control, yellow cap, ready to use, exact concentration see label	1 x 500 µl
CONJ	Conjugate, (anti NT-proCNP-HRPO), amber cap, ready to use	1 x 22 ml
SUB	Substrate (TMB solution), blue cap, ready to use	1 x 22 ml
STOP	STOP solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL ADDED TO THE KIT

- 2 self-adhesive plastic film (alu foil)
- QC protocol
- Protocol sheet
- Instruction manual

4) EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 50 µl, 200 µl, 300 µl and disposable tips
- ELISA reader for absorbance at 450 nm (reference 620 nm)
- Graph paper or software for calculation of results
- Distilled or deionised water

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

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

Sample preparation:

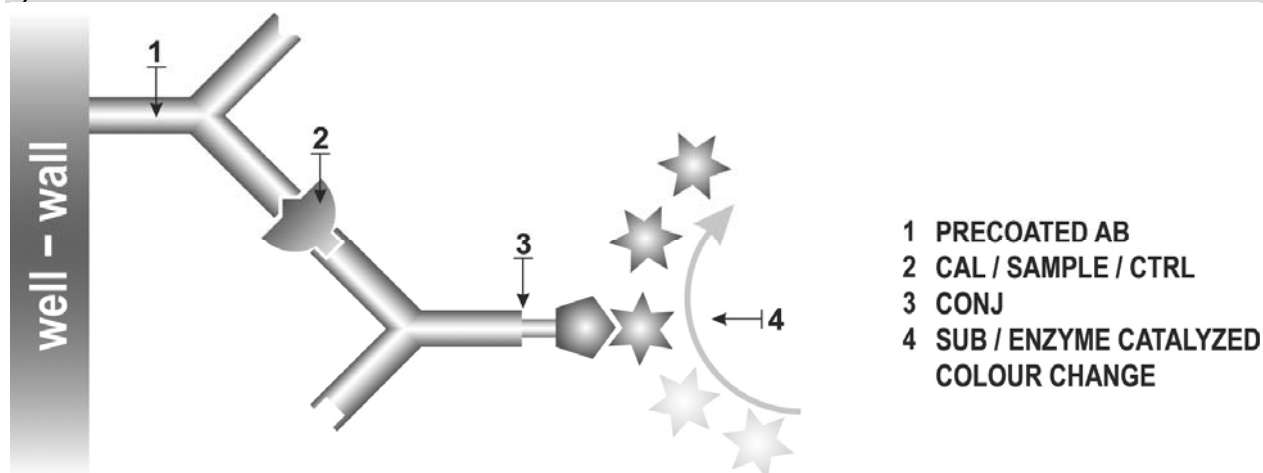
proCNP in freshly collected blood samples is stable for at least 2.5 hrs at RT. Nevertheless we recommend to perform plasma or serum separation by centrifugation as soon as possible (e.g. 20 min at 2000 x g, preferably at +4°C). Aliquot the acquired plasma or serum samples and store them at -20°C or -70°C. Samples can be subjected to 5 freeze-thaw cycles without any loss of immune reactivity. Lipemic or hemolyzed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values. If samples read higher than the top standard, we recommend to dilute them with ASYBUF (dilution buffer) (e.g.: 1+1 and 1+3) and re-measure the samples.

For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability or contact our customer service by e-mail export@bmgrp.at or by phone +43/ 1/ 29107-45.

Rekonstitute as follows:

WASHBUF (Wash buffer): Dilute the concentrate 1:20 (1+19), e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water. Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. Buffer is stable at 2-8°C until expiry date stated on label. Use only diluted WASHBUF (Wash buffer) to perform the assay.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples have to be brought to room temperature (18-26°C) before they can be used in the assay.

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

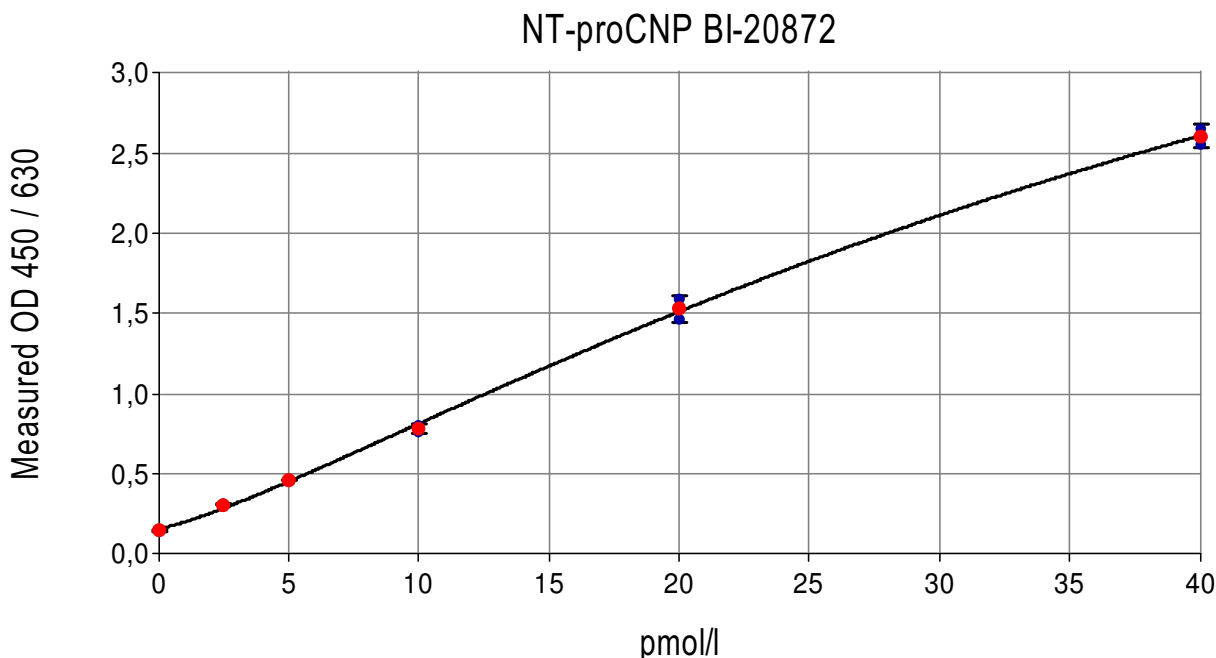
Take microtiter strips out of the alu bag, reserve a minimum of one well as blank. Unused strips can be stored with desiccant in the alu bag at 2-8°C until the expiry date.

1. Add 50 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective wells, except blank.
2. Add 200 µl CONJ (anti NT-proCNP-HRPO) into each well, except blank, swirl gently.
3. **Cover tightly and incubate for 4 hours at room temperature (18-26°C) in the dark.**
4. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the final washing step.
5. Add 200 µl SUB (Substrate) into each well.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (18-26°C) in the dark.**
7. Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well.
8. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 620 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). Subtract the blank OD from the values of STD, CTRL and sample. 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.

Example typical STD-curve:



The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit. Data for optical density 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 optical density of 1.50 or higher is obtained for the standard with the highest concentration.

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Reference data :	Serum, plasma: median: 2.88 pmol/l Each laboratory should establish own normal values.
Standard range:	0 – 40 pmol/l
Conversion factor:	1pg/ml = 0.151 pmol/l (referring to recombinant proCNP 1-64)
Sample volume:	50 µl human serum or plasma
Detection Limit:	(0 pmol/l + 3 SD): 0.55 pmol/l
Incubation time:	4 hours / 30 min
Cross reactivity:	Not determined, homology to other species for the epitopes used in this assay: Epitope 1: rat (88%), sheep (94%), pig (94%), mouse (88%), bovine (88%) Epitope 2: rat (95%), sheep (90%), pig (95%), mouse (95%), bovine (90%)

For further information on assay characteristics please visit our website www.bmgrp.com/products/assay_characteristics or contact our customer service by e-mail export@bmgrp.at or by phone +43/ 1/ 29107-45.

10) PRECISION

Intra-Assay: 2 samples of known concentrations were tested 16 times to assess intra-assay precision

Inter-Assay: 2 samples of known concentrations were tested in 10 assays to assess inter-assay precision

Intra-Assay (n=16)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	24.58	3.08
SD	1.31	0.26
CV%	5.3%	8.3%

Inter-Assay (n=10)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	16.2	10.72
SD	1.11	0.88
CV%	7%	9%

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 use reagents between 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.
- Avoid foaming when mixing reagents.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested with 3rd generation tests against HIV-Ab and HBsAg; and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

All liquid reagents contain 0.01% Proclin 300 as preservative.

Proclin 300 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. The stop solution contains sulfuric acid, contact can lead to irritations of eyes and skin. Flush with water after contact!

13) LITERATURE

“Identification of amino-terminal pro-C-type natriuretic peptide in human plasma”

T.C.R Prickett et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm. 286, 513-517(2001)

“Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK- dependent pathway”

Akihiro Yasoda et al., Nature Medicine 10, 80-86 (Dez 2003)

“C-type natriuretic peptide in reproduction, pregnancy, and fetal development”

T. Walther et al. J. of Endo (2004) 180,17-22

1) EINLEITUNG

CNP gehört zur Familie der Natriuretischen Peptide, wie das Atrial Natriuretische (ANP) und Brain Natriuretische Peptid (BNP) welche wichtige Biomarker und Regulationsmoleküle sind. Sie regulieren den Blutdruck und Flüssigkeitshaushalt und modifizieren Wachstum und Entwicklung von Herzgewebe und Knochen. ANP und BNP sind Herz hormone, welche im Atrium bzw. im Ventrikel gebildet werden und bei erhöhter Belastung des Herzens ausgeschüttet werden. Im Gegensatz zu ANP und BNP wird CNP nur in geringem Umfang im Herzen produziert und stammt daher hauptsächlich aus Gehirn, Hypophyse, vaskulärem Endothelium, den Nieren und den weiblichen Geschlechtsorganen.

Die Natriuretischen Peptide werden als Propeptide ausgeschüttet und dann in ein C-terminales Hormon (biologisch aktiv) und in ein N-terminales Fragment (diese sind NT-proANP 1-98, NT-proBNP 1-76 und NT-proCNP, bei dem die Länge noch diskutiert wird) gespalten. Die N-terminalen Fragmente sind stabiler und kommen in höheren Konzentrationen im Blut vor als die aktiven Hormone. Aus diesem Grund sind die Fragmente analytisch leichter und reproduzierbarer erfassbar als die Hormone. Daher haben wir einen Sandwich Immunoassay mit Antikörpern gegen die Epitope 1-19 und 30-50 von humanem NT-proCNP entwickelt. CNP wird nicht nur im Zusammenhang mit Herzkrankheiten sondern auch beim Längenwachstum von Knochen, Nierenerkrankungen, der Embryonalentwicklung und vaskulären Erkrankungen studiert.

Indikationen:

- vaskuläre Erkrankungen
- Diabetes
- Knochenentwicklung
- Sepsis

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Polyklonaler Schaf anti NT-proCNP Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplatten- streifen im Streifenhalter, verpackt in einem Alubeutel mit Trockenmittel	12 x 8 Teste
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtige Kappe	1 x 50 ml
ASYBUF	Verdünnungspuffer, rote Kappe, gebrauchsfertig	1 x 10 ml
STD	Standards, (0; 2,5; 5;10; 20; 40 pmol/l), weiße Kappen, gebrauchsfertig	6 x 500 µl
CTRL	Kontrolle, gelbe Kappe, gebrauchsfertig, exakte Konzentration siehe Etikett	1 x 500 µl
CONJ	Konjugat, (anti NT-proCNP-HRPO), braune Kappe, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), blaue Kappe, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STOP	Stopplösung, weiße Kappe, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 2 selbstklebende Abdeckfolien (Alufolie)
- QC Protokoll
- Protokollblatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 50µl, 200µ, 300µl, inkl. Pipettenspitzen
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (620 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software
- 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:

ProCNP ist im Vollblut für mindestens 2,5h stabil. Dennoch empfehlen wir, die Plasma- oder Serumseparation durch Zentrifugation so bald wie möglich durchzuführen (z.B. 20 min bei 2000 x g, vorzugsweise bei +4°C). Die gewonnenen Plasma- oder Serumproben sollten aliquotiert und bei -20°C oder -70°C (Langzeitlagerung) aufbewahrt werden. Fünf Frier/Tau-Zyklen verursachen keine Verluste der Immunreaktivität in den Proben. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmungen. Bei Proben, deren Messwert oberhalb des Messbereiches liegt, empfehlen wir diese mit ASYBUF (Verdünnungspuffer) zu verdünnen (z.B.: 1+1 und 1+3) und erneut anzusetzen.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability oder sie kontaktieren unser Kundenservice, Email unter export@bmgrp.at, Tel. unter +43/ 1/ 29107- 45.

Handhabung:

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 verdünnte Puffer ist bei 2-8°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Für die Testdurchführung darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) 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 BLANK/STD/PROBE/CTRL (Leerwert/Standard/Probe/Kontrolle) am Protokollblatt.
Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Alu Säckchen. Mindestens 1 Well für den Leerwert reservieren. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Alu Säckchen bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.
1. Pipettieren Sie 50 µl STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen, mit Ausnahme des Leerwertes.
2. Pipettieren Sie 200 µl CONJ (anti NT-proCNP-HRPO) in alle Wells mit Ausnahme des Leerwertes, gut mischen.
3. Streifen abdecken und 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.
4. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5. Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat) in alle Wells.
6. 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.
7. Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells.
8. Sofort die Extinktion bei 450 nm messen, falls möglich 620 nm als Referenz verwenden.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die optische Dichte (OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450nm Filter (Referenz 630nm). Die OD des Leerwertes ist von den Werten der STD, CTRL und Proben abzuziehen. Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde evaluiert mit einem 4 Parameter Algorithmus. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen.

Typische STD-Kurve:

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

Auf dem beigegepackten QC Protokoll sind die Resultate bei der QC Freigabe des Kits vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der optischen Dichte (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 des höchsten Standards den Wert 1,50 oder höher erreicht.

9) TESTMERKMALE

Referenz Daten:	Serum , Plasma: Median: 2,88 pmol/l, Jeder Verwender sollte den Normalbereich seiner Proben evaluieren.
Standardbereich:	0 – 40 pmol/l
Umrechnungsfaktor pg/ml zu pmol/l:	1pg/ml = 0.151 pmol/l (bezogen auf recombinant proCNP 1-64)
Probenvolumen:	50 µl Serum oder Plasma
Detektionsgrenze:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,55 pmol/l
Inkubationszeiten:	4 Stunden / 30 Min
Kreuzreaktivitäten	Nicht ermittelt, Homologien zu anderen Spezies bezogen auf die benutzten Epitope: Epitop 1: Ratte (88%), Schaf (94%), Schwein (94%), Maus (88%), Rind (88%) Epitop 2: Ratte (95%), Schaf (90%), Schwein (95%), Maus (95%), Rind (90%)

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen finden sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com/products/assay_characteristics oder sie kontaktieren unser Kundenservice, Email unter export@bmgrp.at, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45

10) PRÄZISION

Intra-Assay: 2 Proben wurden 16 mal in Doppelbestimmung in einem Test getestet.

Inter-Assay: 2 Proben wurden in Doppelbestimmung in 10 Tests getestet.

Intra-Assay (n=16)		
Durchschnitt (pmol/l)	24,58	3,08
SD	1,31	0,26
VK%	5,3%	8,3%

Inter-Assay (n=10)		
Durchschnitt (pmol/l)	16,2	10,72
SD	1,11	0,88
VK%	7%	9%

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Testen dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel oder 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.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden mit Testen der 3. Generation auf HIV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0,01% Proclin 300 als Konservierungsmittel.

Proclin 300 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut.

Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe zur Vermeidung jedes Kontaktes mit Reagenzien.
- Die Stopplösung enthält Schwefelsäure, welche bei Kontakt die Augen und Haut reizen kann. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) LITERATURE im englischen Teil des Beipacktextes.

1) INTRODUCTION

Le CNP est membre d'un groupe bien caractérisé de peptides natriurétiques, tels que le peptide natriurétique atrial (ANP) et le peptide natriurétique cérébral (BNP), qui jouent divers rôles essentiels en tant que mécanismes de régulation et marqueurs biologiques. Ils participent à la régulation de la pression sanguine et à l'homéostasie hydrique de l'organisme et modifient la croissance et le développement des tissus cardio-vasculaires et des os. L'ANP et le BNP sont des hormones cardiaques sécrétées par les oreillettes et les ventricules, respectivement, dans le cœur normal de l'adulte. Contrairement à l'ANP et au BNP, le tissu cardiaque produit très peu de CNP, qui est principalement exprimé dans le cerveau, l'hypophyse, l'endothélium vasculaire, le rein et l'appareil reproducteur de la femme.

Tous les peptides natriurétiques sont produits sous forme de propeptides, ultérieurement segmentés en hormone C-terminale biologiquement active et en fragment N-terminal (NT-proANP 1-98, NT-proBNP 1-76 et NT-proCNP, dont la séquence fait toujours l'objet de discussions). Ces fragments N-terminaux étant bien plus stables et circulant en quantités plus élevées que les hormones actives, leur mesure dans le sérum ou le plasma est plus aisée et plus fiable. Nous avons donc développé un immunodosage type sandwich pour le NT-proCNP à l'aide d'anticorps dirigés contre les acides aminés 1-19 et 30-50. Le rôle physiologique du CNP est non seulement étudié dans les pathologies cardiaques, mais également dans la biologie du développement osseux, généralement dans la recherche sur l'os, les maladies rénales, la recherche sur le développement embryonnaire et les pathologies vasculaires.

Indications:

- pathologie vasculaire
- diabète
- développement du squelette
- sepsis

2) CONTENU DE LA TROUSSE

CONT	COMPOSANTS DE LA TROUSSE	QUANTITE
PLATE	barrettes de microtitrage revêtues d'anticorps polyclonal de mouton anti NT-proCNP avec portoir pour barrettes dans un sac alu avec dessiccateur	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampon de lavage, concentré 20x, bouchon neutre	1 x 50 ml
ASYBUF	Tampon de dosage, bouchon rouge, prêt à l'emploi	1 x 10 ml
STD	Standards, (0; 2.5; 5; 10; 20; 40 pmol/l), bouchon blanc, prêt à l'emploi	6 x 500µl
CTRL	Contrôle, prêt à l'emploi, bouchon jaune; voir l'étiquette pour la concentration exacte	1 x 500µl
CONJ	Conjugué, (anti NT-proCNP- HRPO), bouchon orange, prêt à l'emploi	1 x 22 ml
SUB	Substrat (solution TMB), bouchon bleu, prêt à l'emploi	1 x 22 ml
STOP	Solution STOP, bouchon blanc, prête à l'emploi	1 x 7 ml

3) AUTRE MATERIEL INCLUS DANS LA TROUSSE

- 2 bandes de film plastique adhésif (feuille d'aluminium)
- Protocole Qualité
- Feuille de protocole
- Manuel d'utilisation

4) MATERIEL ET EQUIPEMENT NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision calibrées pour délivrer de 50µl, 200µl, 300µl et embouts jetables
- Lecteur de microplaques ELISA pour la mesure de l'absorbance à 450 nm (référence 620 nm)
- Papier millimétré pour le calcul des résultats
- Eau distillée ou désionisée

5) PREPARATION DES REACTIFS ET DES ECHANTILLONS

Tous les réactifs de la trousse restent stables à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption (voir étiquette du réactif).

Préparation des échantillons:

Le proCNP des échantillons de sang fraîchement collectés est stable pendant au moins 2h30 à température ambiante. Nous recommandons néanmoins d'effectuer une séparation du plasma ou du sérum par centrifugation dès que possible (par ex., 20 min à 2 000 x g, de préférence à +4°C). Après les avoir aliquotés, conserver les échantillons de plasma ou de sérum acquis à -20°C ou -70°C. Les échantillons peuvent être soumis à 5 cycles de congélation / décongélation sans perte de réaction immunitaire. Les échantillons lipémiques ou hémolysés peuvent fournir des résultats erronés. Les échantillons doivent être bien mélangés avant le dosage. Nous recommandons de pratiquer les dosages en double pour toutes les valeurs. Si les échantillons indiquent une valeur plus élevée que le standard supérieur, nous recommandons leur dilution avec l'ASYBUF (Tampon de dilution) (par ex. : au 1+1 ou 1+3) et d'effectuer une nouvelle mesure des échantillons.

Vous trouverez de plus amples informations sur la stabilité des échantillons en consultant notre site web à l'adresse www.bmgrp.com/products/assay_characteristics/sample_stability ou contactez notre service clientèle à l'adresse email export@gmbrp.at, ou en composant le numéro de téléphone +43/1/29107-45.

Manipulation:

WASHBUF (Tampon de lavage): Diluer le concentré à 1:20 (1 + 19). Par exemple, 50 ml de WASHBUF + 950 ml d'eau distillée. Les cristaux dans le concentré de lavage se dissoudront à température ambiante. Le tampon reste stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette. Utiliser uniquement du WASHBUF (Tampon de lavage) dilué pour l'exécution du dosage.

6) PRINCIPE DU DOSAGE

Voir au chapitre 6) PRINCIPLE OF THE ESSAY de la version anglaise de la notice.

7) PROTOCOLE DU DOSAGE

Tous les réactifs et échantillons doivent être portés à température ambiante (18-26°C) avant leur utilisation dans le dosage.
Marquer la position du BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Blanc/Standard/Echantillon/Contrôle) sur la feuille du protocole.
Sortir les barrettes de microtitrage du sac alu, marquer au minimum un puits comme Blanc. Conserver les barrettes non-utilisées avec le dessiccateur à 2-8°C dans le sac alu jusqu'à la date d'expiration.
1. Ajouter 50 µl de STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Echantillon/Contrôle) en double dans chaque puits, sauf le blanc.
2. Ajouter 200 µl de CONJ (anti NT-proCNP-HRPO) dans chaque puits, sauf le blanc, puis agiter doucement.
3. Couvrir hermétiquement et incuber pendant 4 heures à température ambiante (18-26 °C) à l'abri de la lumière.
4. Aspirer et laver 5 fois les puits avec 300 µl de WASHBUF (Tampon de lavage) dilué. Après le dernier lavage, taper la plaque contre une serviette afin d'enlever les dernières gouttes de WASHBUF.
5. Ajouter 200 µl de SUB (Substrat) dans chaque puits.
6. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (18-26 °C) dans le noir.
7. Ajouter 50 µl de STOP (Solution stop) dans chaque puits.
8. Mesurer immédiatement l'absorbance à 450 nm avec une référence à 620 nm, si possible.

8) CALCUL DES RESULTATS

Mesurez la densité optique (DO) de chaque puits avec un photomètre pour microplaques à filtre de 450 nm (Référence 630 nm). Soustraire l'absorbance du blanc des valeurs STD, CTRL et des échantillons. Construire la courbe d'étalonnage à partir des valeurs des étalons, utilisant du papier millimétré vendu couramment dans le commerce ou un logiciel prévu à cet effet. Le système de dosage a été évalué avec un algorithme à quatre paramètres (4PL). Des algorithmes d'évaluation différents doivent être évalués par l'utilisateur. La concentration des échantillons devra être reportée sur la courbe d'étalonnage.

Courbe STD typique:

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

Le protocole de contrôle qualité fourni avec le kit présente les résultats de la dernière série QC de chaque trousse. Les données de densité optique obtenues par les utilisateurs peuvent être différentes de celles obtenues par le Laboratoire de Contrôle. Cela dépend de plusieurs facteurs et notamment de la perte du signal que l'on constate pendant la durée de vie d'un kit. Cependant, ceci n'a pas d'incidence sur la validité des résultats, à partir du moment où la D.O. du standard ayant la concentration la plus élevée est au moins égale à 1,50 unités.

9) CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

Gamme des valeurs normales:	Sérum, plasma : médiane = 2.88 pmol/l Chaque laboratoire doit établir sa propre gamme de valeurs normales.
Gamme standard:	0 – 40 pmol/l
Facteur de conversion:	1pg/ml = 0.151 pmol/l (en référence recombinante proCNP 1-64)
Volume de l'échantillon:	50 µl sérum ou plasma humain
Limite de detection:	(0 pmol/l + 3 SD): 0.55 pmol/l
Temps d'incubation:	4 heures / 30 min
Réaction croisée:	Non déterminée, homologie avec d'autres espèces pour les épitopes utilisés dans ce dosage: Epitope 1 : rat (88 %), mouton (94 %), cochon (94 %), souris (88 %), bovin (88 %) Epitope 2 : rat (95 %), mouton (90 %), cochon (95 %), souris (95 %), bovin (90 %)

Vous trouverez de plus amples informations sur la stabilité des échantillons en consultant notre site web à l'adresse www.bmgrp.com/products/assay_characteristics ou contactez notre service clientèle à l'adresse email export@gmgrp.at, ou en composant le numéro de téléphone +43/1/29107-45.

10) PRECISION

Précision intra-série : 2 échantillons ont été testés 16 fois en double lors d'un essai

Précision inter-séries : 2 échantillons ont été testés 10 fois en double pendant 10 essais

Intra-Essai (n=16)			Inter-Essai (n=10)		
Moyenne (pmol/l)	24.58	3.08	Moyenne (pmol/l)	16.2	10.72
SD	1.31	0.26	SD	1.11	0.88
CV%	5.3%	8.3%	CV%	7%	9%

11) CONSEILS TECHNIQUES

- Ne pas remplacer ou mélanger les réactifs qui sont fournis avec ce kit avec ceux de lots ou de sources différents.
- Ne pas mélanger les embouts ou bouchons de réactifs différents, ni utiliser les réactifs d'autres lots.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date d'expiration.
- Protéger les réactifs contre la lumière.
- Les solutions d'amplificateur doivent être incolores.
- Pour obtenir les résultats fiables, il est essentiel de sceller correctement la microplaque pendant les étapes d'incubation.
- Eviter de faire mousser les réactifs lors du mélange.

12) PRECAUTIONS

Les produits d'origine humaine utilisés dans ce test ont été testés avec les essais de troisième génération contre le VIH-Ab et l'AgHbs et ont été trouvés négatifs. Cependant, ils doivent être manipulés comme étant susceptibles de transmettre des maladies infectieuses. Tous les réactifs liquides contiennent 0.01% de Proclin 300 comme conservateur. Éviter tout contact avec la peau et la muqueuse. Proclin 300 n'est pas toxique dans les concentrations utilisées dans cette trousse. Cependant, il peut entraîner les réactions allergiques et tout contact avec la peau ou les yeux doit être évité.

- Ne pas pipetter avec la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer, ni appliquer les produits cosmétiques pendant la manipulation des réactifs.
- Porter les gants pour éviter tout contact avec les réactifs.
- L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Laver avec de l'eau en cas de contact. Éviter le contact avec la peau et les muqueuses. Les irritations sont possibles. Laver avec de l'eau en cas de contact !!

13) LITERATURE

Voir au chapitre 13) LITERATURE dans la version anglaise de cette notice.

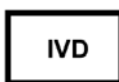
SYMBOLS



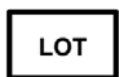
Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



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 para 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 zdravotnícký materiál (určené pre diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero 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 / Katalogové 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 / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí



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 / Indeholder 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

BI-20872 NT-proCNP

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/diluted sample/diluted control) into each well, except blank.
- Step 2) Add 200 µl CONJ (Conjugate) into each well, except blank, swirl gently.
- Step 3) Cover tightly and incubate for 4 hours at room temperature (18-26°C) in the dark.**
- Step 4) Aspirate and wash wells with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- Step 5) Add 200 µl SUB (Substrate) into each well.
- 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.
- Step 8) Read optical density at 450 nm with reference 620 nm, if available.