

BNP FRAGMENT EIA


ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION
OF BNP FRAGMENT IN BIOLOGICAL FLUIDS
CAT. NO. BI-20852 12 X 8 TESTS

ENZYMIMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON BNP FRAGMENT IN BIOLOGISCHEN
FLÜSSIGKEITEN
KAT. NR. BI-20852 12 X 8 TESTE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

rev.no. 080401 (replacing 071220)

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

BIOMEDICA
BIOMEDICA
GRUPPE 
www.bmgrp.com
1/12

CONTENT / INHALT

- 1. ENGLISH 3**
- 2. DEUTSCH ... 7**

*Additional Information about our products is available on our website.
Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich.*

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

Atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP) are members of a family of hormones secreted from the atrium, ventricle, and vascular endothelial cells. Three receptors, type A (specific for ANP and BNP), type B (specific for CNP and ANP) and the clearance receptor, have been characterised.

The mature form of BNP, secreted predominantly by the cardiac ventricle, is formed from a high molecular weight precursor, proBNP (1-108).

BNP is stored in the human cardiac tissue mainly as BNP-32, with a lesser amount of the precursor peptide, proBNP (1-108). The circulating plasma forms of BNP are BNP-32, a high molecular weight BNP form that has not been well identified, the BNP fragment and the amino-terminal portion proBNP (1-76)

BNP elicits a spectrum of diuretic, natriuretic and hypotensive effects similar to those induced by ANP. Recent research suggests that natriuretic peptides are important protectors against fluid overload and high blood pressure. Control of fluid and electrolyte balance as well as circulatory homeostasis also involves other regulatory mechanism, including the renin-angiotensin system, vasopressin, and the sympathetic nervous system. The discovery of natriuretic peptides has focused attention on an additional endocrine system that contributes to diuresis and vascular tone. The biology, biochemistry and the pathophysiological role of natriuretic peptides are described in recent reviews.

POSSIBLE INDICATIONS

- Cardiac impairment , Acute Myocardial Infarction, (left ventricular dysfunction)
- Renal failure
- Liver disease
- Various forms of secondary hypertension

2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	polyclonal anti BNP fragment (8-29) antibody coated microtiterstrips in stripholder packed in alubag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer, 20x concentrated, natural cap	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay Buffer, red cap, ready to use	1 x 60 ml
STD	Standard, synthetic human BNP fragment, white cap, lyophilised, exact concentration after reconstitution see label	1 vial lyophilised
CTRL	Control, yellow cap, synthetic human BNP fragment, lyophilised exact concentration after reconstitution see label	1 vial lyophilised
CONJ	Conjugate, (synthetic BNP fragment -HRPO), red dye, amber cap, ready to use	1 x 6 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

- 2 self-adhesive plastic films
- QC protocol
- Protocol sheet
- Instruction manual for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1.5 ml reaction vials
- Precision pipettes calibrated to deliver 50-1000 µl and disposable tips
- ELISA reader for absorbance at 450nm (or from 450nm to 620nm)
- Graph paper or software for calculation of results
- Distilled or deionised water

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

BNP fragments are stable in whole blood, serum or plasma for several hours at room temperature or 4°C. 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.

Samples and Control have to be diluted 1:6 (1+ 5) in ASYBUF (Assay buffer) before being assayed. (eg. 100 µl sample + 500 µl Assay buffer).

Reconstitution/Handling:

- 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) for the assay performance.
- STD (Standard): Pipette 3 ml ASYBUF (Assay buffer) to the vial. Leave at room temperature (18-26°C) for 30 min. The reconstituted standard has a concentration of 1,000 fmol/ml and is stable at -20°C until expiry date on label. Avoid freeze-thaw cycles.
- CTRL (Control): Pipette 250 µl of distilled or deionised water to the vial. Leave at room temperature (18-26°C) for 30 min. Reconstituted control is stable at -20°C until expiry date on label. Avoid freeze-thaw cycles.

Prepare a 1:2 dilution series with the reconstituted STD and ASYBUF (Assay buffer)

STD1 = reconstituted STD (1.000 fmol/ml)

500 µl STD1 + 500 µl ASYBUF = STD2 (500 fmol/ml)

500 µl STD2 + 500 µl ASYBUF = STD3 (250 fmol/ml)

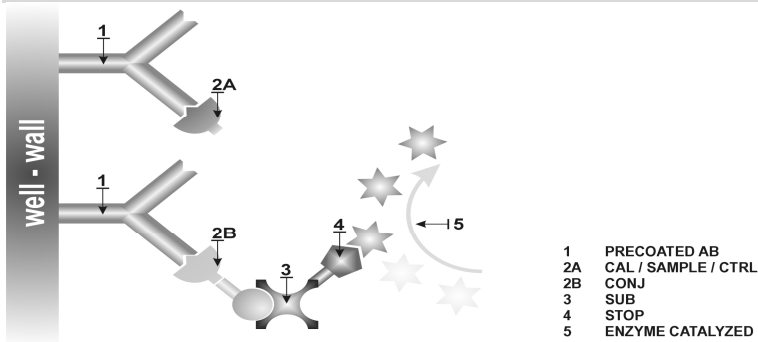
500 µl STD3 + 500 µl ASYBUF = STD4 (125 fmol/ml)

500 µl STD4 + 500 µl ASYBUF = STD5 (62.5 fmol/ml)

500 µl STD5 + 500 µl ASYBUF = STD6 (31.25 fmol/ml)

Use ASYBUF as STD0 (Standard 0)

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use 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, take a minimum of one well as blank. Store unused strips with desiccant at 2-8°C in the alu bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.
Add 200 µl ASYBUF (Assay buffer) into the well marked as blank.
Add 200 µl STD/diluted SAMPLE/diluted CTRL (Standards/diluted Sample/diluted Control) in duplicate into respective well, except blank.
Add 50 µl CONJ (Conjugate) into each well, except blank, swirl gently.
Cover tightly and incubate overnight (24-25 hours) at 4°C in the dark.
Aspirate and wash wells 5x with 300µl diluted WASHBUF (Wash buffer), remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the latest wash.
Add 200 µl SUB (Substrate) into each well.
Incubate for 20 min at room temperature (18-26°C) in the dark.
Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well.
Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 620 nm, if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Subtract the blank extinction from all other values. Construct the standard curve from the standard values. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this standard curve. The assay has been evaluated using a 4PL algorithm. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user. Respective dilution factors have to be considered.

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 1.00 is obtained for the standard with the lowest concentration.

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Reference range:	A panel of blood donors (n=110) showed a median of 208 fmol/ml (95th perc. 300 fmol/ml). Each laboratory has to establish its own reference range for the samples under investigation	
Standard range:	0 to 1,000 fmol/ml	
Sample volume:	100 µl human serum or plasma	
Detection Limit:	5 fmol/ml at 95% B/Bo	
Incubation time:	24 hrs / 20 min	

10) PRECISION

Intra-Assay (n=16)			Inter-Assay (n=3)		
Mean (fmol/ml)	320	666	Mean (fmol/ml)	320	666
SD (fmol/ml)	20.8	26.6	SD (fmol/ml)	14.08	25.3
CV%	6.5%	4.0 %	CV%	4.4 %	3.8 %

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 0.1% 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.
- Sulfuric acid is irritating to eyes and skin. Flush with water if contact occurs. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible - Flush with water after contact!!

13) LITERATURE

N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide as an Indicator of Possible Cardiovascular Disease in Severely Obese Individuals: Comparison with Patients in Different Stages of Heart Failure
Hermann-Arnhofer K et al Clinical Chemistry. 2005;51:138-143

Neurohormonal risk stratification for sudden death and death owing to progressive heart failure in chronic heart failure
Berger R et al European Journal of Clinical Investigation 2005, 35 (1), 24-31

Risk assessment in patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction and normal N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels by N-terminal pro-atrial natriuretic peptide
Jarai R et al. European Heart Journal 2004, 26 (3) 250-256

1) EINLEITUNG

Atrial natriuretisches Peptid (ANP), Brain natriuretisches Peptid (BNP) und C-Typ natriuretisches Peptid sind Peptide einer Familie von Hormonen, welche von Atrium, Ventrikel und vaskulären Endothelzellen sekretiert werden. Es wurden folgende 3 Rezeptoren charakterisiert: Type A (spezifisch für ANP und BNP), Type B (spezifisch für CNP und ANP) sowie der Clearance Rezeptor.

Die reife Form des BNP wird hauptsächlich vom kardiologischen Ventrikel sekretiert und wird vom precursor proBNP (1-108) ausgehend gebildet.

BNP ist im humanen Herzgewebe hauptsächlich als BNP-32 (einer hochmolekulare BNP Form, welche noch nicht genau identifiziert ist) vorhanden, sowie einem geringeren Gehalt von proBNP (1-108). Es zirkuliert im Plasma als BNP-32, als amino terminaler Teil proBNP (1-76) und als Fragment davon. Vergleichbar mit ANP, werden durch BNP diuretische, natriuretische und hypotensive Effekte ausgelöst. Forschungsstudien zeigen, dass natriuretische Peptide ein wichtiger Schutz gegen Bluthochdruck sind. Die Kontrolle der Blutfüssigkeit und des Elektrolyten Gleichgewichtes inkludiert auch andere Regulationsmechanismen wie das Renin-Angiotensin System, Vasopressin oder das sympathische Nervensystem. Die Erforschung der natriuretischen Peptide ist wichtig, da es als zusätzliches endokrinologisches System einen Beitrag zur Diuresis bietet. Die biologische, biochemische und pathophysiologische Rolle der natriuretischen Peptide ist in neueren Arbeiten beschrieben.

MÖGLICHE INDIKATIONEN

- Studie von Herzfehlern, Akuter Myokardinfarkt (LVD etc)
- Nierenversagen
- Leberkrankheiten
- Verschiedene Formen des sekundären Bluthochdrucks

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Polyklonaler anti BNP Fragment (8-29) Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Alu Säckchen mit Trockenmittel	12 x 8 Teste
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtige Kappe	1 x 50 ml
ASYBUF	Verdünnungspuffer, rote Kappe, gebrauchsfertig	1 x 60 ml
STD	Standard, Synthetisches humanes BNP Fragment, weisse Kappe, lyophilisiert, genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett	1 Fläschchen
CTRL	Kontrolle, Synthetisches humanes BNP Fragment, gelbe Kappe, lyophilisiert, genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett	1 Fläschchen
CONJ	Konjugat, (Synthetisches BNP Fragment -HRPO), rot gefärbt, braune Kappe, gebrauchsfertig	1 x 6 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), blaue Kappe, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STOP	Stopp Lösung, H ₂ SO ₄ , weisse Kappe, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- QC Protokoll
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

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.
Pipettieren Sie 200 µl ASYBUF (Verdünnungspuffer) in die Wells markiert als Leerwert.
Pipettieren Sie 200 µl STD/verdünnte PROBE/verdünnte CTRL (Standard/verdünnte Probe/verdünnte Kontrolle) in Doppelbestimmung in alle Wells, außer dem Leerwert.
Pipettieren Sie 50 µl CONJ (Konjugat) in alle Wells außer dem Leerwert, gut mischen.
Streifen abdecken und über Nacht (24-25 Stunden) bei 4°C im Dunkeln inkubieren.
Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünnten WASHBUF (Waschpuffer) waschen.
Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrate) in alle Wells.
20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.
Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells.
Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 620 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die OD des Leerwertes ist von allen Wells abzuziehen. Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den Werten der Standards 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 von der Eichkurve abgelesen. Mögliche Verdünnungsfaktoren müssen bei der Berechnung beachtet werden.

Auf dem beige packten 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 niedersten Standards den Wert 1,00 erreicht.

9) TESTMERKMALE

Referenzwerte:	In einem Blutspenderkollektiv wurde ein Median von 208 fmol/ml (95. Perc 300 fmol/ml) gefunden. Jeder Verwender sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren.
Standardbereich	0 bis 1.000 fmol/ml
Probenvolumen:	100 µl humanes Serum oder Plasma
Detektionsgrenze:	5 fmol/ml bei 95% B/Bo
Inkubationszeiten:	24 h / 20 Min

10) PRÄZISION

Intra-Assay (n=16)			Inter-Assay (n=3)		
Durchschnitt (fmol/ml)	320	666	Durchschnitt (fmol/ml)	320	666
SD (fmol/ml)	20,8	26,6	SD (fmol/ml)	14,08	25,3
VK%	6.5%	4.0 %	VK%	4.4 %	3.8 %

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 0,1% Proclin 300 als Konservierungsmittel.

Proclin 300 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen und Haut.

- 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.
- Schwefelsäure reizt die Augen und die Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide as an Indicator of Possible Cardiovascular Disease in Severely Obese Individuals: Comparison with Patients in Different Stages of Heart Failure
Hermann-Arnhof K et al Clinical Chemistry. 2005;51:138-143

Neurohormonal risk stratification for sudden death and death owing to progressive heart failure in chronic heart failure
Berger R et al European Journal of Clinical Investigation 2005, 35 (1), 24-31

Risk assessment in patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction and normal N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels by N-terminal pro-atrial natriuretic peptide
Jarai R et al. European Heart Journal 2004, 26 (3) 250-256

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 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 / Referentinummer / 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 / Opbevaars 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 / Innehåller räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

BI-20852 BNP FRAGMENT EIA

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

- 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.
- Add 200 µl ASYBUF (Assay buffer) into the well marked as blank.
- Add 200 µl STD/diluted SAMPLE/diluted CTRL (standard/diluted sample/diluted control) into all wells, except blank.
- Add 50 µl CONJ (Conjugate) into each well, except blank, swirl gently.
- Cover tightly and incubate overnight (24-25 hours) at 4°C, in the dark.**
- Aspirate and wash wells with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- Add 200 µl SUB (Substrate) into each well.
- Incubate at for 20 minutes room temperature (18-26°C), in the dark.**
- Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well.
- Read Optical Density at 450 nm with reference 620 nm, if available.