

ENDOSTATIN

(EN) ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF
ENDOSTATIN IN HUMAN URINE, SERUM, CITRATE PLASMA, EDTA PLASMA,
AND HEPARIN PLASMA
CAT. NO. BI-20742 . 12 X 8 TESTS

(DE) ENZYM IMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON
ENDOSTATIN IN HUMANEM URIN, SERUM, CITRAT PLASMA, EDTA PLASMA
UND HEPARIN PLASMA
KAT. NR. BI-20742 . 12 X 8 TESTS

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

rev.no. 220524 (replacing 200819)

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



CONTENT / INHALT

ENGLISH	Page 3
DEUTSCH	Seite 8

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

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

Endostatin, a 20-kDa C-terminal proteolytic fragment of collagen XVIII, is an endogenous angiogenesis inhibitor localized in the vascular basement membrane in various organs (<http://www.uniprot.org/uniprot/P39060>). The biological functions of the endostatin-network involve SPARC, thrombospondin-1, glycosaminoglycans, collagens, and integrins. Endostatin is expressed during the progression of renal fibrosis in tubular cells of injured tissue. In renal micro-vascular disease, observed in late stages of patients with chronic kidney disease, increased endostatin levels are possibly the consequence of enhanced extracellular matrix degradation. Thus, endostatin may become an important marker for progressive microvascular renal disease in patients with chronic kidney disease. Endostatin levels in blood are also likely to increase in patients with other microvascular tissue injuries, including atherosclerosis, myocardial- and brain ischemia. In ischemic stroke patients, high endostatin plasma levels predict a worse long-term clinical outcome. Endostatin has recently been shown to be an independent risk factor of graft loss after kidney transplant as demonstrated in a prospective observational cohort study in 574 maintenance kidney transplant recipients.

Areas of interest:

- Micro-vascular injury
- Atherosclerosis
- Graft loss
- Chronic kidney disease
- Ischemia

2) CONTENT OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Goat polyclonal anti-Endostatin antibody, pre-coated microtiter strips in a strip-holder, packed in an aluminium bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 ml
AB	Rabbit polyclonal anti-Endostatin antibody – biotin labelled, green cap, green dye, ready to use	1 x 7 ml
STD	Standards 1-7, (0; 25; 50; 100; 200; 400; 800 pmol/l), white caps, ready to use	7 x 400 µl
CTRL	Controls, A + B, (exact concentration on the label), yellow cap, ready to use	2 x 400 µl
ASYBUF	Assay Buffer, red cap, ready to use	1 x 100 ml
CONJ	Conjugate, (streptavidin-HRP), amber bottle, amber cap, ready to use	1 x 22 ml
SUB	Substrate (TMB solution), amber bottle, blue cap, ready to use	1 x 22 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL IN THE KIT

- 2 self-adhesive plastic films
- Protocol sheet
- Quality control protocol
- Instruction for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm (with correction wavelength at 630 nm)

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents as supplied in the kit are stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on the label of each reagent. Serum, plasma (EDTA, heparin, citrate), and urine are suitable for use in this assay. Do not change sample type during studies.

Sample preparation:

Urine samples: We recommend first-morning-void urine. **Use urine samples undiluted.**

If urine samples read higher than STD7, it is recommended to dilute urine samples with assay buffer 1+3 and test again.

Serum and plasma samples:

Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes. Perform plasma or serum separation by centrifugation according to supplier's instructions of the blood collection devices. Assay the acquired samples immediately or aliquot and store at -25°C or lower. Lipemic or haemolyzed samples may give erroneous results. Samples are stable for up to 4 freeze-thaw cycles. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values.

Serum and plasma samples must be diluted 1+100 with assay buffer (ASYBUF), eg. 10 µl sample + 1000 µl ASYBUF. Diluted samples are stable at 4°C (2-8°C) overnight. Thus, dilutions can be prepared one day before analysis. Dilution factor has to be considered when calculating the final concentration of the sample.

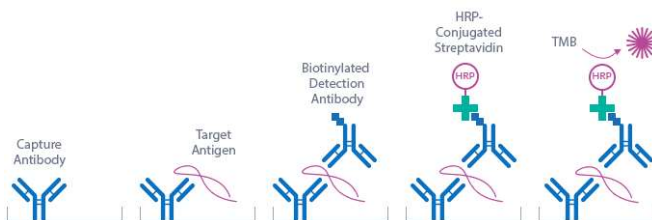
For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com (see Validation Data) or contact our customer service by e-mail info@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

Reconstitution/Handling:

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. The undiluted WASHBUF is stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on label. The diluted WASHBUF is stable up to one month at 4°C (2-8°C). Only use diluted WASHBUF when performing the assay.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY

This kit is a sandwich enzyme immunoassay for the determination of Endostatin in human urine, serum or plasma samples. In a first step, STD/sample/CTRL and detection antibody (rabbit polyclonal anti-human Endostatin-Biotin) are pipetted into the wells of the microtiter strips, which are pre-coated with anti-Endostatin antibody. Endostatin present in the STD/sample/CTRL binds to the pre-coated antibody in the well and forms a sandwich with the detection antibody. In the washing step all non-specific unbound material is removed. In a second step, the conjugate (Streptavidin-HRP) is pipetted into the wells and reacts with the detection antibody. After another washing step, the substrate (TMB Tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme catalysed color change of the substrate is directly proportional to the amount of Endostatin. This color change is detectable with a standard microtiter plate ELISA reader. The concentration of Endostatin in the sample is determined directly from the dose response curve.



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-24°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 aluminium bag. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

1. Pipette 100 µl ASYBUF (Assay Buffer, red cap) into each well.
2. Add 20 µl of STD/pre-diluted* SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well.
**Use urine samples undiluted. Use 1+100 pre-diluted serum and plasma samples, see chapter 5) Reagents and sample preparation.*
3. Add 50 µl AB (Antibody) into each well. Swirl gently.
4. **Cover tightly and incubate 3 hours at room temperature (18-24°C).**
5. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
6. Add 200 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well.

7. Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-24°C).
8. Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
9. Add 200 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well.
10. Incubate for 30 min at room temperature (18-24°C) in the dark.
11. Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well. Swirl gently.
12. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells with 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. Respective dilution factors, e.g. 1:101 for serum and plasma samples, have to be considered when calculating the final concentration of the sample.

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 the STD with the highest concentration and the value of the CTRL is in range (target range see label).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Method:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well strips
Sample type:	Urine, serum, EDTA plasma, citrate plasma, and heparin plasma
Standard range:	0 to 800 pmol/l (7 standards and 2 controls)
Conversion factor:	Endostatin: 1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 20 kDa)
Sample volume:	20 µl / well (urine: undiluted; serum and plasma: diluted 1+100 in ASYBUF)
Incubation time:	3 h / 1 h / 30 min
Sensitivity:	LOD: (0 pmol/l + 3 SD); 4 pmol/l; LLOQ: 3 pmol/l
Specificity:	This assay recognizes endogenous and recombinant human Endostatin. There is no cross reactivity with human recombinant Collagen Type XV (COL15).

Precision:	Intra-assay (n=5) ≤ 6% Inter-assay (n=16) ≤ 5%		
Spike/Recovery (average recovery spiked with 100 pmol/l rec. Endostatin):	Urine (n=8): 87%		
	Serum (n=16): 120%	EDTA plasma (n=12): 106%	
Dilution linearity (average recovery of expected Endostatin after dilution):	Citrate plasma (n=8): 85%	Heparin plasma (n=4): 96%	
	<u>Dilution:</u>	<u>1+1</u>	<u>1+3</u>
	Urine (n=6)	103%	123%
	Serum (n=4)	116%	125%
	EDTA plasma (n=4)	120%	134%
	Citrate plasma (n=4)	101%	112%
Values from apparently healthy individuals:	Heparin plasma (n=4)		
	Median urine (n=789): 20 pmol/l Median serum (n=59): 5151 pmol/l (5.2 nmol/l) Median citrate plasma (n=30): 4747 pmol/l (4.7 nmol/l) Each laboratory should establish its own reference range for the samples under investigation. Do not change sample type during the study.		

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

Intra-assay: 2 samples of known concentrations were tested 5 times within 1 kit lot by 1 operator.

Inter-assay: 2 samples of known concentrations were tested 16 times within 2 different kit lots and by 3 different operators.

Intra-assay (n=5)	Sample 1	Sample 2		Inter-assay (n=16)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	52	416		Mean (pmol/l)	50	405
SD (pmol/l)	0.9	23.6		SD (pmol/l)	2.1	21.6
CV (%)	2	6		CV (%)	4	5

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 colorless 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 against HIV-Ab, HCV-Ab and HBsAg and were found to be negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

Liquid reagents contain ≤0.1% Proclin 950 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 950 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.
- Wear gloves, glasses and lab jacket while performing this assay.
- Sulfuric acid is irritating to the eyes and skin. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible. – Flush with water if contact occurs!!

13) LITERATURE

1. Endostatin Is an Independent Risk Factor of Graft Loss after Kidney Transplant. *Chu C et al., 2020, Am J Nephrol* 51:373–380.
2. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of endostatin levels in mice as a biomarker of developing glomerulonephritis. *Wallwitz J et al., 2019, PLoS One, 14(8): e0220935.*
3. Higher Parathyroid Hormone Level Is Associated with Increased Arterial Stiffness in Type 1 Diabetes *Zobel EH et al., 2017, Diabetes Care* 40(3):dc162428.
4. Endostatin in Chronic Kidney Disease: Associations with Inflammation, Vascular Abnormalities, Cardiovascular Events and Survival. *Kanbay M et al., 2016 European Journal of Internal Medicine : 81–87.*
5. Elevated plasma levels of endostatin are associated with chronic kidney disease. *Chen et al., 2012, Am J Nephrol* 35(4): 335-340.
6. Early-onset coronary artery disease after pediatric kidney transplantation: implicating the angiogenesis inhibitor, endostatin. *Iqbal CW et al., 2011, Am Surg* 77(6): 731-735.
7. A defective angiogenesis in chronic kidney disease. *Futrakul N et al., 2008, Ren Fail* 30(2): 215-217.
8. Excretion of anti-angiogenic proteins in patients with chronic allograft dysfunction. *Moskowitz-Kassai E et al., 2012, Nephrol Dial Transplant* 27(2): 494-497.
9. Endostatin and angiostatin are increased in diabetic patients with coronary artery disease and associated with impaired coronary collateral formation. *Sodha NR et al., 2009, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 296: H428-H434.*
10. A large screening of angiogenesis biomarkers and their association with neurological outcome after ischemic stroke. *Navarro-Sobrino M et al., 2011, Atherosclerosis, 216(1): 205-211.*

1) EINLEITUNG

Endostatin, ein 20-kDa C-terminales proteolytisches Fragment von Kollagen XVIII, ist ein endogener Angiogenese-Hemmer, welches in der vaskulären Basalmembran in verschiedenen Organen lokalisiert ist (<http://www.uniprot.org/uniprot/P39060>). Die biologische Funktion des Endostatin-Netzwerkes involviert SPARC, Thrombospondin-1, Glycosaminoglycane, Kollagene und Integrine. Endostatin wird während der Progression bei Nierenfibrose in Tubuluszellen verletzter Gewebe exprimiert. Bei renalen mikrovaskulären Erkrankungen, die bei Patienten in späten Stadien chronischer Nierenerkrankung auftreten, sind erhöhte Endostatin Werte möglicherweise die Folge eines verstärkten Abbaus der extrazellulären Matrix. Demzufolge könnte Endostatin ein wichtiger Marker für die progressive mikrovaskuläre Erkrankung bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen sein. Erhöhte Endostatin Werte im Blut sind demnach auch bei Patienten mit anderen mikrovaskulären Gewebe Verletzungen, einschließlich Arteriosklerose, Herzinfarkt und Gehirnschämie, wahrscheinlich. In Patienten mit ischämischem Schlaganfall sind hohe Endostatin Plasma Werte ein Prädiktor für eine Verschlechterung des klinischen Verlaufs. In einer rezenten Studie wurde gezeigt, dass Endostatin ein unabhängiger Risikofaktor für einen Transplantatverlust nach einer Nierentransplantation ist.

Interessensgebiete:

- Mikrovaskuläre Verletzungen
- Atherosklerose
- Transplantatverlust
- Chronische Nierenerkrankungen
- Ischämie

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	polyklonaler Ziege anti-Endostatin Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter, verpackt im Aluminiumbeutel mit Trockenmittel	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
AB	polyklonaler Kaninchen anti-Endostatin Antikörper, biotinyliert, grüner Schraubverschluss, grün gefärbt, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
STD	Standards 1-7 (0; 25; 50; 100; 200; 400; 800 pmol/l), weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	7 x 400 µl
CTRL	Kontrollen A+B (genaue Konzentration siehe Etikett), gelber Schraubverschluss, gebrauchsfertig	2 x 400 µl
ASYBUF	Verdünnungspuffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 100 ml
CONJ	Konjugat (Streptavidin-HRPO), braune Flasche, brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung), braune Flasche, blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STOP	Stopp Lösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

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

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl, inkl. Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software

5) REAGENZIEN- UND PROBEVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenzes) stabil. Serum, Plasma (EDTA, Heparin, Citrat) und Urin sind geeignete Probenmatrizes in diesem Test. Die Probenmatrix innerhalb einer Studie nicht wechseln.

Probenvorbereitung:

Urin-Proben: bei Urin Proben wird Morgenurin empfohlen. **Urinproben unverdünnt testen.**

Bei Proben Werten >STD7 kann die Probe 1+3 mit ASYBUF (Verdünnungspuffer) verdünnt und erneut getestet werden.

Serum und Plasma Proben:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Plasma oder Serum. Durchführung der Zentrifugation des Blutes laut Herstellerangaben der Probenentnahmebehälter, so schnell wie möglich. Das gewonnene Plasma oder Serum sollte sofort gemessen oder für Langzeitlagerung aliquotiert und bei -25°C oder tiefer gelagert werden. Bis zu 4 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 müssen 1+100 mit Verdünnungspuffer (ASYBUF) verdünnt werden, zB. 10 µl Probe + 1000 µl

ASYBUF. Verdünnte Proben können auf 4°C (2-8°C) über Nacht gelagert werden, d.h. die Probenverdünnung kann einen Tag vor Testansatz durchgeführt werden.

Zur Berechnung der Probenendkonzentration müssen die Probenverdünnungen berücksichtigt werden.

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

Rekonstitution/Handhabung:

WASHBUF (Waschpuffer): Salzkristalle im Pufferkonzentrat sind normal. Lösen Sie die Salzkristalle bei Raumtemperatur auf und verdünnen Sie das Pufferkonzentrat mit destilliertem oder deionisiertem Wasser 1:20 (zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser). Unverdünnter WASHBUF ist bei 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum am Etikett haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF verwendet werden.

6) TESTPRINZIP

Beschreibung und Schema 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 (18-24°C) aufweisen. Markieren Sie die Positionen für STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) am Protokoll Blatt.

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

1) Pipettieren Sie 100 µl ASYBUF (Verdünnungspuffer, roter Schraubverschluss) in alle Wells.

2) Pipettieren Sie 20 µl STD /verdünnte* PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen.

**Verwenden Sie Urinproben unverdünnt, Serum bzw. Plasma Proben 1+100 verdünnt.
Probenverdünnung siehe Kapitel 5) Reagenzien- und Probenvorbereitung.*

3) Pipettieren Sie 50 µl AB (Antikörper) in alle Wells, vorsichtig mischen.

4) Streifen abdecken und 3 Stunden bei Raumtemperatur (18-24°C) inkubieren.

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

6) Pipettieren Sie 200 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells.

7) Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-24°C) inkubieren.

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

9) Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells.

10) 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-24°C) im Dunkeln inkubieren.

11) Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells, vorsichtig mischen.

12) 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. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen oder errechnet. Das Testsystem wurde mit einem 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Zur Berechnung der Probenkonzentration müssen die Probenverdünnungen 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 bei der QC Freigabe des Kits 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 des höchsten Standards den Wert 1,50 oder höher erreicht und die Werte der CTRL im jeweils gültigen Bereich sind (Bereich siehe Etikett).

9) TESTMERKMALE

Siehe 9) *ASSAY CHARACTERISTICS* im englischen Teil des Beipacktextes bzw. finden Sie detaillierte Informationen zu den Testmerkmalen auf unserer Website unter www.bmgrp.com (siehe [Validation Data](#)) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice, E-mail unter info@bmgrp.com, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

10) PRÄZISION

Intra-assay: 2 Proben wurden 5mal in einem Test von einem Operator getestet.

Inter-assay: 2 Proben wurden 16mal in 2 verschiedenen Tests von 3 unterschiedlichen Operatoren getestet.

Intra-assay (n=5)	Probe 1	Probe 2		Inter-assay (n=16)	Probe 1	Probe 2
Mittelwert (pmol/l)	52	416		Mittelwert (pmol/l)	50	405
SD (pmol/l)	0,9	23,6		SD (pmol/l)	2,1	21,6
VK (%)	2	6		VK (%)	4	5

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.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

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, Schutzbrillen 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.

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 / 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 / Opbevaeres mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v 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 / 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-20742 ENDOSTATIN

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- Bring all reagents to room temperature (18-24°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Take microtiter strips out of the aluminium bag and mark positions on the protocol sheet.
- Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.

TEST PROCEDURE:

- Step 1) Pipette 100 µl ASYBUF (red cap) into respective well.
- Step 2) Add 20 µl of **STD/pre-diluted* SAMPLE/CTRL** (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well.
- Step 3) Add 50 µl AB (biotinylated anti-Endostatin antibody, green cap, green dye) into each well, swirl gently.
- Step 4) Cover tightly and incubate 3 hours at room temperature (18-24°C).**
- Step 5) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
- Step 6) Add 200 µl CONJ (Conjugate, amber cap) into each well.
- Step 7) Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-24°C).**
- Step 8) Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). After final wash, remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel.
- Step 9) Add 200 µl SUB (Substrate, blue cap) into each well.
- Step 10) Incubate for 30 min at room temperature (18-24°C) in the dark.**
- Step 11) Add 50 µl STOP (Stop solution, white cap) into each well. Swirl gently.
- Step 12) Read Optical Density

**For sample dilution see chapter 5) Reagent and Sample Preparation.*