



DCM180-1
Ed. 01/2015

Troponin I

Determinazione immunoenzimatica quantitativa di Troponina I nel siero umano

per solo uso di ricerca

RUO



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO180

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Diametra Troponin I è un metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione dei Troponina I nel siero umano.

Il kit Troponina I è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

La Troponina I è una proteina di 24 kDa e fa parte di un complesso, chiamato "complesso Troponina", che regola l'interazione modulata da calcio tra l'actina e la miosina nel muscolo striato; il complesso è un eterodimero formato dalla Troponina C, I e T; la Troponina I è la subunità inibitoria del complesso.

Il complesso delle Troponine è strettamente legato all'apparato contrattile, ma molti studi hanno dimostrato che la Troponina I è rilasciata all'interno della circolazione sanguigna in caso di danni al miocardio, come accade nell' Infarto Miocardico Acuto (AMI, Acute Myocardial Infarction), dove la miofibrilla è seriamente danneggiata. Nel sangue la Troponina I permane per molti giorni dopo l'AMI, pertanto la detezione dei livelli di Troponina I nel sangue rappresenta un eccellente biomarker per eventuali danni al miocardio.

Da notare che nel caso di maratoni o altre lesioni scheletriche la Troponina I non è stata trovata nel sistema circolatorio, pertanto risulta essere uno specifico marcatore per l'AMI.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Nel primo step il siero ed il Coniugato sono aggiunti alla micropietra coattata con streptavidina. Il Coniugato contiene 2 anticorpi monoclonali diretti contro differenti epitopi di Troponina I: un anticorpo è biotinilato, l'altro è legato a perossidasi di rafano (HRP); questi anticorpi competono per la Troponina I nativa nel campione, quindi durante la prima incubazione viene a formarsi un sandwich tra gli anticorpi e la Troponina I nel campione; questo complesso si lega alla micropietra attraverso l'interazione della biotina con la streptavidina.

Alla fine dell'incubazione, la separazione libero/legato è effettuata tramite uno step di lavaggio.

Nello step successivo, l'enzima HRP presente nella frazione legata reagisce con il Substrato e si sviluppa

una colorazione blu; la reazione è stoppata con l'aggiunta della Stop Solution.

La concentrazione della Troponina I nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, liofilizzati)

CAL0	REF DCE002/18006-0
CAL1	REF DCE002/18007-0
CAL2	REF DCE002/18008-0
CAL3	REF DCE002/18009-0
CAL4	REF DCE002/18010-0
CAL5	REF DCE002/18011-0

Ricostituire ogni flacone con 1 mL di acqua distillata o deionizzata.

2. Conjugate (1 flacone, 13 mL, pronto all'uso)

Anticorpo monoclonale biotinilato anti Troponina I e monoclonale anti Troponina I coniugato a perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/18002-0

3. Coated Microplate (1 micropietra breakable)

Micropietra coattata con streptavidina

REF DCE002/18003-0

4. Substrate A (1 flacone, 7 mL)

Contiene tetrametil-benzidina (*evitare il contatto con la pelle*)

REF DCE004/18004A-0

5. Substrate B (1 flacone, 7 mL)

Contiene perossido di idrogeno (*evitare il contatto con la pelle*)

REF DCE004/18004B-0

6. Stop Solution (1 flacone, 8 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (*evitare il contatto con la pelle*)

REF DCE005/18005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

Tampone fosfato

REF DCE006/18006-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropietre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 3 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.

- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione del Substrato

Mischiare l'intero contenuto del flacone di Substrate A all'interno del flacone di Substrate B. Agitare bene. Il Substrato è ora pronto per essere usato nel dosaggio. Il Substrato è stabile per 2 mesi, conservare a 2-8°C.

6.2. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono liofilizzati e sono calibrati contro lo Standard NIST #2921 per la Troponina I. I Calibratori hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	1	3	6	15	30

Ricostituire ogni flacone con 1 mL di acqua distillata o deionizzata; i Calibratori ricostituiti sono stabili per 24 ore a 2-8°C; per conservazioni più lunghe aliquotare i Calibratori e porli a -20°C (non congelare e scongelare più di una volta).

Eventuali campioni con concentrazione di Troponina I maggiore di 30 ng/mL devono essere diluiti con il Calibratore 0 o con un siero privo di Troponina I; considerare questa diluizione nel calcolo finale della concentrazione di Troponina I nel campione di partenza.

6.3. Preparazione del campione

La determinazione della Troponina I con il presente kit va effettuata su siero umano.

Il campione può essere conservato a 2-8°C per 5 giorni; per conservazioni più lunghe, fino a 30 giorni, conservare a -20°C (evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento).

6.4. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	25 µL		
Campione		25 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Agitare delicatamente la micropiastra per 20-30 secondi. Coprire la micropiastra con una pellicola di plastica. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare 3 volte aggiungendo in ogni pozzetto 350 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra invertita su fogli di carta assorbente.			
Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Non agitare dopo l'aggiunta del Substrato. Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22-28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	50 µL	50 µL	50 µL
Agitare delicatamente la micropiastra per 15-20 secondi. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Troponina I per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza in funzione delle concentrazioni dei calibratori (C₀-C₅)
Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in ng/mL.

8.4. Validazione dei Risultati

Devono essere rispettati i seguenti criteri:

Calibratore	Assorbanza (OD)
Cal 0	OD ≤ 0.070
Cal 5	OD ≥ 1.300

Fare riferimento in ogni caso al Certificato di Analisi specifico del lotto.

9. VALORI ATTESI

I seguenti valori, ottenuti da dati clinici in accordo alla letteratura pubblicata, devono essere utilizzati solo come una linea guida:

	Valori Troponina I
Adulto - normale	≤ 1.3 ng/mL

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è $\leq 3,3\%$.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 7,9\%$.

10.2. Sensibilità

La concentrazione minima di Troponina I misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,03 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.3. Specificità

Eventuali cross-reazioni sono state valutate aggiungendo le sostanze interferenti ad alte concentrazioni ad un campione sierico:

Sostanza	Cross-reattività
Emoglobina	ND
CK-MB	ND
TnT	ND
FABP	ND

10.4. Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit Diametra Troponin I è stato comparato con un kit RIA. Sono stati testati i campioni di siero di 151 soggetti sintomatici e asintomatici.

La curva di regressione è:

$$y = 0,9266 x + 0,35$$

$$r^2 = 0,950$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

BIBLIOGRAFIA

1. Apple Fred S, Christenson RH, Valdes RJ, Andriak AB, Duh Show-Hong, Feng YJ, Saeed AJ, Johnson Nancy J, Koplen Brenda, Mascotti K, and Wu Alan J, "Simultaneous Rapid Measurement of Whole Blood Myoglobin, Creatine Kinase MB, and Cardiac Troponin I by the Triage Cardiac Panel for Detection of Myocardial Infarction", *Clin Chem*, **45**, 199-205 (1999).
2. Adams JE, Schechtman KB, Landt Y, et al, "Comparable detection of acute Myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I", *Clin Chem*, **40**,1291-5 (1994).
3. Apple FS, Preese LM, "Creatine kinase-MB: detection of Myocardial infarction and monitoring reperfusion", *J Clin Immunoassay*,**17**, 24-9 (1994).
4. Bhayana V, Cohoe S, Leung FY, et al, "Diagnostic evaluation of creatine kinase-2 mass and creatine kinase-3 and -2 isoform ratios in early diagnosis of acute Myocardial infarction", *Clin Chem*, **39**, 488-95 (1993).

5. Bruns DE, "Diagnosis of acute Myocardial infarction when skeletal muscle damage is present: a caveat regarding use of creatine kinase isoenzymes", *Clin Chem*, **35**, 705 (1989).
6. Gibler WB, Lewis LM, Erb RE, et al, "Early detection of acute Myocardial infarction in patients presenting with chest pain and nondiagnostic ECGs; serial Troponin-I sampling in the emergency department", *Ann Emerg Med*, **19**, 1359-66 (1990).
7. Henderson AR, Stark JA, McQueen MJ, et al, "Is determination of creatine kinase-2 after electrophoretic separation accurate?", *Clin Chem*, **40**, 177-83 (1994).
8. Kallner A, Sylven C, Brodin U, et al, "Early diagnosis of acute Myocardial infarction; a comparison between chemical predictors", *Scand J Clin Lab Invest*, **49**, 633-9 (1989).
9. Kiyasu Y, "Current status of detecting Troponin-I for patient management", *Am Clin Prod Rev*, **4**, 29-31(1985).
- 10.Lang H, Wuerzburg U, "Creatine kinase, an enzyme of many forms", *Clin Chem*, **28**, 1439-47 (1982).
- 11.Lee KN, Csako G, Bernhardt P, Elin RJ, "Relevance of macro creatine kinase type 1 and type 2 isoenzymes to laboratory and clinical data", *Clin Chem*, **40**, 1278-83 (1994).
- 12.Lee TH, Rouan GW, Weisberg MC, et al, "Sensitivity of routine clinical criteria for diagnosing Myocardial infarction within 24 hours of hospitalization", *Ann Intern Med*, **106**, 181-6 (1987).
- 13.Panteghini M, "Creatine kinase MB isoforms", *J Clin Immunoassay*, **17**, 30-4 (1994).

Ed. 01/2015

DCM180-1

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595

Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06034 SPELLO (PG) Italy

Tel. 0039-0742-24851

Fax 0039-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM180-1
Ed. 01/2015

Troponin I

Quantitative Immunoenzymatic determination of Troponin I in human serum

for research use only

RUO



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO180

INTENDED USE

Diametra Troponin I kit is an immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Troponin I concentration in human serum.

Troponin I kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Troponin I is a 24kDa protein and is part of a complex, called Troponin complex, that regulates the calcium-modulate interaction between actin and myosin in the striated muscle; this complex is an heterodimer consisting of Troponin C, I and T; Troponin I is the inhibitory subunit of this complex.

Troponin complex is tightly bound to the contractile apparatus, but many studies shows that the Troponin I is released into the blood circulation in case of myocardial damage, such as in AMI (Acute Myocardial Infarction), where the myofibril is seriously damaged. The presence of Troponin I in the circulation can be detected for many days after AMI, thus the detection of Troponin levels in blood fluids is an excellent biomarker for myocardial damage.

It should be note that in case of marathon runners or other skeletal injury the Troponin I has not been found in circulation, thus it is a very specific marker for AMI.

2. PRINCIPLE

In the first step the serum sample and the Conjugate are added to the microplate coated with Streptavidin. The Conjugate contains two monoclonal antibodies direct against different epitopes of Troponin I: one is biotinylated, the other one is bound to the horseradish peroxidase (HRP); these antibodies compete for the native Troponin I in the sample, thus at the end of first step a sandwich between the antibodies and the Troponin I is formed; this complex binds to the microplate wells through the specific interaction between biotine and streptavidin.

At the end of incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

In the next step, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate and develops a blu color; the reaction is stopped by adding the Stop Solution.

The concentration of Troponin I in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, lyophilized)

CAL0	REF DCE002/18006-0
CAL1	REF DCE002/18007-0
CAL2	REF DCE002/18008-0
CAL3	REF DCE002/18009-0
CAL4	REF DCE002/18010-0
CAL5	REF DCE002/18011-0

Reconstitute each vial with 1 mL of distilled or deionized water.

2. Conjugate (1 vial, 13 mL, ready to use)

Monoclonal biotinylated anti Troponin I antibody and monoclonal anti Troponin I antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) REF DCE002/18002-0

3. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with Streptavidin

REF DCE002/18003-0

4. Substrate A (1 vial, 7 mL)

Contains tetramethylbenzidine (TMB) (avoid any skin contact) REF DCE004/18004-0

5. Substrate B (1 vial, 7 mL)

Contains H₂O₂ (avoid any skin contact)

REF DCE004/18004-0

6. Stop Solution (1 vial, 8 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005/18005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

Phosphate buffer

REF DCE006/18006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

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

Open the bag of reagent 3 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed.. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added

in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.

- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of Working Substrate

Put the content of the Substrate A into the bottle of Substrate B. Mix well. The reagent is now ready to be used during the assay.

The Substrate is stable for 2 months, store at 2-8°C.

6.2. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The Calibrators are lyophilized and are calibrated against NIST standards for Troponin I # 2921; they have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	1	3	6	15	30

Reconstitute each vial with 1 mL of distilled or deionized water; reconstitute Calibrators are stable for 24 hours at 2-8°C; for longer storage aliquot the Calibrators and store at -20°C (do not freeze and thaw more than once).

Samples with Troponin I concentration higher than 30 ng/mL should be diluted with the Calibrator 0 or with a serum Troponin I-free; consider this dilution in the final calculation of the original sample.

6.3. Preparation of the Sample

The determination of Troponin I with Diametra Troponin I kit should be performed in human serum.

The samples can be stored at 2-8°C for 5 days; for longer storage up to 30 days store at -20°C (avoid repetitive freezing and thawing).

6.4. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.

- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Sample		25 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Swirl the microplate gently for 20-30 seconds to mix. Cover with a plastic wrap. Incubate for 15 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 350 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.			
Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Do not shake after substrate addition. Incubate at room temperature (22±28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	50 µL	50 µL	50 µL
Shake the microplate gently for 15-20 seconds. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Troponin I for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the values of absorbance (Em) of the Calibrators (C₀-C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/mL.

8.4. Validation of Results

The following criteria should be met:

Calibrator	Absorbance (OD)
Cal 0	OD ≤ 0.070
Cal 5	OD ≥ 1.300

Please refer always to the Certificate of Analysis lot-specific.

9. EXPECTED VALUES

The following range obtained by clinical data in concordance with the published literature should be used as a guidelines only:

	Troponin I value
Adult - normal	≤ 1.3 ng/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate the measurement (20x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is ≤ 3.3%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate the measurement (10x) of three different control sera in different lots of kit. The between assay variability is ≤ 7.9%.

10.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Troponin I that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.03 ng/mL at the 95% confidence limit.

10.3. Specificity

The cross reaction was evaluated by adding the interfering substances to a serum sample at a very high concentration:

Substance	Cross reactivity
Hemoglobin	ND
CK-MB	ND
TnT	ND
FABP	ND

10.4. Correlation with RIA

Diametra Troponin I kit was compared to a radioimmunoassay kit. Serum samples from 151 symptomatic and asymptomatic persons were analysed according to both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.9266 x + 0.35$$

$$r^2 = 0.950$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Apple Fred S, Christenson RH, Valdes RJ, Andriak AB, Duh Show-Hong, Feng YJ, Saeed AJ, Johnson Nancy J, Koplen Brenda, Mascotti K, and Wu Alan J, "Simultaneous Rapid Measurement of Whole Blood Myoglobin, Creatine Kinase MB, and Cardiac Troponin I by the Triage Cardiac Panel for Detection of Myocardial Infarction", *Clin Chem*, **45**, 199-205 (1999).
2. Adams JE, Schechtman KB, Landt Y, et al, "Comparable detection of acute Myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I", *Clin Chem*, **40**, 1291-5 (1994).
3. Apple FS, Preese LM, "Creatine kinase-MB: detection of Myocardial infarction and monitoring reperfusion", *J Clin Immunoassay*, **17**, 24-9 (1994).
4. Bhayana V, Cohoe S, Leung FY, et al, "Diagnostic evaluation of creatine kinase-2 mass and creatine kinase-3 and -2 isoform ratios in early diagnosis of acute Myocardial infarction", *Clin Chem*, **39**, 488-95 (1993).
5. Bruns DE, "Diagnosis of acute Myocardial infarction when skeletal muscle damage is present: a caveat regarding use of creatine kinase isoenzymes", *Clin Chem*, **35**, 705 (1989).
6. Gibler WB, Lewis LM, Erb RE, et al, "Early detection of acute Myocardial infarction in patients presenting with chest pain and nondiagnostic ECGs; serial Troponin-I sampling in the emergency department", *Ann Emerg Med*, **19**, 1359-66 (1990).
7. Henderson AR, Stark JA, McQueen MJ, et al, "Is determination of creatine kinase-2 after electrophoretic separation accurate?", *Clin Chem*, **40**, 177-83 (1994).
8. Kallner A, Sylven C, Brodin U, et al, "Early diagnosis of acute Myocardial infarction; a comparison between chemical predictors", *Scand J Clin Lab Invest*, **49**, 633-9 (1989).
9. Kiyasu Y, "Current status of detecting Troponin-I for patient management", *Am Clin Prod Rev*, **4**, 29-31(1985).
10. Lang H, Wuerzburg U, "Creatine kinase, an enzyme of many forms", *Clin Chem*, **28**, 1439-47 (1982).
11. Lee KN, Csako G, Bernhardt P, Elin RJ, "Relevance of macro creatine kinase type 1 and type 2 isoenzymes to laboratory and clinical data", *Clin Chem*, **40**, 1278-83 (1994).
12. Lee TH, Rouan GW, Weisberg MC, et al, "Sensitivity of routine clinical criteria for diagnosing Myocardial infarction within 24 hours of hospitalization", *Ann Intern Med*, **106**, 181-6 (1987).
13. Panteghini M, "Creatine kinase MB isoforms", *J Clin Immunoassay*, **17**, 30-4 (1994).

Ed. 01/2015

DCM180-1

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595

Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06034 SPELLO (PG) Italy

Tel. 0039-0742-24851

Fax 0039-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

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

Too low reaction (too low ODs)

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

Too high reaction (too high ODs)

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

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation