

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	8

CONTENT

1. INTENDED USE	9
2. SUMMARY AND EXPLANATION	9
3. PRINCIPLE OF THE TEST	10
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	10
5. KIT COMPONENTS	11
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	12
7. TEST PROCEDURE	12
8. QUALITY CONTROL	14
9. CALCULATION OF RESULTS	14
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	15
12. LITERATURE	15

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРОПОНИНА I В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «ТРОПОНИН I-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТРОПОНИН I-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации тропонина I в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Количественное определение Тропонина I (ТнI) позволяет проводить лабораторную диагностику острого инфаркта миокарда (ОИМ), повторного ИМ и ИМ, развившегося на фоне тяжелой органической патологии миокарда. ТнI – белок с молекулярной массой 22.5 кД – входит в состав тропонинового комплекса, играющего важную роль в регуляции мышечных сокращений клеток поперечно-полосатой мускулатуры и миокарда. Известно три изоформы ТнI человека: две специфичны для скелетной мускулатуры, и одна – для миокарда. Кардиоспецифическая изоформа ТнI не экспрессируется ни в каких иных тканях, кроме миокарда. Ее структурные отличия позволяют с помощью иммунологических методов отличать ее от других изоформ ТнI. ТнI появляется в кровотоке через 4-6 часов после развития характерного болевого приступа; его уровень достигает максимума в течение первых 16-20 часов. В течение первого дня после инфаркта кинетика высвобождения ТнI из некротических тканей миокарда аналогична кинетике выхода СКМВ, на протяжении последнего десятилетия считающегося «золотым» стандартом в диагностике ОИМ. Однако в то время, как уровень СКМВ остается повышенным лишь в течение двух-трех дней после развития болевого приступа, ТнI в кровотоке определяется на протяжении одной недели после развития первых симптомов заболевания. Поэтому ТнI может использоваться не только для ранней, но и для отдаленной диагностики ОИМ, когда образец сыворотки получен спустя несколько дней после развития болевого приступа. В этом отношении ТнI сходен с ТнТ – другим представителем тропонинового семейства из группы маркеров поражения миокарда. Вместе с тем, было показано (Adams et al., Amer. Heart J, 1996; 131:308-12), что в отсутствие каких-либо проявлений ишемической болезни сердца концентрации ТнТ (равно как и уровни СКМВ) в крови нередко повышаются у больных, находящихся на хроническом диализе, а также у пациентов с хроническими заболеваниями скелетной мускулатуры. Это объясняется тем, что у больных этой группы кардиоспецифические формы ТнТ и СКМВ могут экспрессироваться в скелетной мускулатуре. В то же время экспрессии кардиоспецифической формы ТнI в скелетной мускулатуре и повышения концентрации этого маркера в крови больных данной группы выявлено не было.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение тропонина I основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к тропонину I человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание Тропонина I, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к Тропонину I человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации тропонина I в исследуемом образце. Концентрацию тропонина I в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания тропонина I в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Использование мышинных моноклональных антител к Тропонину I позволяет достичь высокой специфичности анализа

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания Тропонина I в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ТРОПОНИН I-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации Тропонина I в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей Тропонин I, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.3-10 нг/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации Тропонина I предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 1 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «ТРОПОНИН I-ИФА» концентрация Тропонина I в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.25 нг/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P291Z	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C291Z	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества тропонина I – 0; 0.3; 1; 3; 10 нг/мл, лиофилизированы (по 1 мл каждая)	5	шт.	Лиофильно высушенные (после восстановления ления: прозрачные жидкости красного цвета; калибровочная проба 0 - прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q291Z	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием тропонина I, лиофилизирована (1 мл)	1	шт.	Лиофильно высушенная (после восстановления ления: прозрачная жидкость пурпурного цвета)
4	T291Z	Конъюгат, готов к использованию (6 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость пурпурного цвета
5	R055Z	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (1.1 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	Концентрат отмывочного раствора, 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	Стоп-реагент, готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
9	K291I	Инструкция по применению Набора реагентов «ТРОПОНИН I-ИФА»	1	шт.	-
10	K291Q	Паспорт контроля качества Набора реагентов «ТРОПОНИН I-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержащего лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета. Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора. Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

7.4. Подготовка калибровочных проб. Приготовьте калибровочные пробы и контрольную сыворотку: добавьте 1 мл бидистиллированной воды в каждый флакон и тщательно перемешайте. Жидкие калибраторы должны быть использованы в течение 1 часа; для повторного использования их рекомендуется заморозить

в аликвотах при температуре ниже 15 °С. Для более длительного хранения калибраторы можно аликвотировать и хранить замороженными при температуре ниже -15 °С. ВНИМАНИЕ: допускается не более 1 цикла замораживания-оттаивания!

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «ТРОПОНИН I-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

Допускается однократное замораживание (-20 °С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- лиофильно высушенные калибровочные пробы и контрольную сыворотку следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации тропонина I в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Приготовьте калибровочные пробы и контрольную сыворотку: добавьте 1 мл бидистиллированной воды в каждый флакон и тщательно перемешайте. Жидкие калибраторы должны быть использованы в течение 1 часа; для повторного использования их рекомендуется заморозить в аликвотах при температуре ниже 15 °С; для более длительного хранения калибраторы можно аликвотировать и хранить замороженными при температуре ниже -15 °С. ВНИМАНИЕ: Допускается не более 1 цикла замораживания-оттаивания!
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыоротки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5-10 минут.
4	Внесите во все лунки по 50 мкл конъюгата.
5	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
8	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
9	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставьте по калибровочной пробе С1.
10	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – концентрация Тропонина I в калибровочных пробах (нг/мл), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
11	Определите по калибровочному графику содержание Тропонина I в исследуемых образцах.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций Тропонина I в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.25 нг/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (10 нг/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация Тропонина I ниже 0.25 нг/мл или выше 10 нг/мл.

Исследуемая группа	Единицы, нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	-	0.5

11. ЛИТЕРАТУРА

1. David C Gaze and Paul O Collinson – Multiple molecular forms of circulating cardiac troponin: analytical and clinical significance. *Ann Clin Biochem*, Jul 2008; 45: 349 – 355.
2. Laura Coudrey – The Troponins. *Arch Intern Med*, Jun 1998; 158: 1173 – 1180.

По вопросам, касающимся качества Набора «**ТРОПОНИН I-ИФА**», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
 105043, Москва, а/я 58,
 тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)
 электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
 интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com
 Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
 к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF TROPONIN I IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of Troponin I in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of Troponin I in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

During the last decade cardiac TnI has been proved to be one of the most specific and sensitive markers of acute myocardial infarction (AMI), perioperative myocardial infarction, and other types of myocardial tissue damage.

TnI is a protein with MW 22.5 kDa and comprises a component of troponin complex, or simply troponin. Troponin plays an important role in the regulation of striated and cardiac muscle contraction and consists of three components – troponin C (TnC), troponin I (TnI) and troponin T (TnT), each of them performing specific roles. Three isoforms of TnI are known for human muscular tissue – two isoforms are characteristic for skeletal muscles and one isoform is strictly cardiac-specific. The structural differences enable to discriminate between skeletal and cardiac isoforms of TnI by immunological methods.

TnI appears in the bloodstream within 4–6 hours after onset of the chest pain attack and reaches its peak level during the first 16–20 hours. Within the first day after AMI cardiac TnI is released from necrotic myocardial tissue showing similar pattern to CKMB – the 'golden' AMI marker of the 1990s. However, while CKMB remains elevated for two-three days after onset of the chest pain, TnI can be detected in serum or plasma for up to one week after the first symptoms of the AMI. Therefore, TnI can be used not only for rapid diagnostics of AMI, but also for late evaluation, if serum testing was non-available during the acute phase.

This property of TnI assay makes TnI to resemble TnT – another representative of the troponin family among cardiac markers. However, it has been demonstrated that TnT (as well as CKMB) concentrations may be increased in chronic dialysis patients and in patients with chronic skeletal muscle disease even in the absence of ischaemic heart disease. This fact is explained by expression of cardiac isoform of TnT and CKMB in abnormal skeletal muscle in such groups of patients. On the contrary, no expression of cardiac TnI was detected in skeletal muscles of the patients with chronic renal and skeletal muscle diseases and the concentration of this analyte in such groups of patients mostly remains within the cut-off level.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to human Troponin I-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Second antibodies – murine monoclonal to human Troponin I, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	Troponin I EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp. date
2	polystyrene microwells coated with murine monoclonal to human Troponin I	5	pcs	red (C1 – colourless)	2 months / see p. 5.3
3	human Troponin I diluted in tris buffered preservative – 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride; also contains red dye	1	pcs	purple	2 months / see p. 5.3
4	dilution of preselected human serum, with high content of Troponin I with preservative – 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride; also contains purple dye	1	pcs	purple	until exp. date
5	aqueous solution of murine monoclonal to human Troponin I coupled with horseradish peroxidase diluted on phosphate buffered solution with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative and purple dye	1	pcs	colourless	until exp. date
6	ready-to-use single-component tetramethylbenzidine (TMB) solution.	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp. date Diluted washing solution – 1 month at 2...+8°C or 5 days at RT
7	aqueous solution of sodium chloride and detergent (Tween 20), contains proClin300 as a preservative	1	pcs	colourless	until exp. date
8	5,0% vol/vol solution of sulphuric acid	2	pcs		N/A
9	Plate sealing tape	1	pcs		N/A
10	Instruction Troponin I EIA QC data sheet Troponin I EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±0.1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

For long term storage it is recommended to freeze the calibrators in aliquoted portions and store below -15 °C. ATTENTION: AVOID REPEATED FREEZE-THAW CYCLES.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1-5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Before first use of the kit dissolve the calibrators: add 1 ml deionized water to each vial and mix thoroughly avoiding foam formation. Liquid calibrators should be assayed within an 1 hour, aliquoted and stored frozen below -15 °C. For long term storage it is recommended to freeze the calibrators in aliquoted portions and store below -15 °C. ATTENTION: AVOID MORE THAN 1 FREEZE-THAW CYCLES!
3	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1-5, control samples CONTROL and unknown samples into the wells.
4	Dispense 50 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 60 minutes at 37 °C .
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) by distilled water. Wash the strips 5 times.
7	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
8	Incubate 10-20 minutes at 18...+25 °C
9	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
10	Measure OD (optical density) at 450 nm.
11	Set photometer blank on first calibrator
12	Apply point-by-point method for data reduction.

7.5. Handling notes
Calibrators and control sample(s) – only one freezing/thawing cycle is allowed

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of *GLP* (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

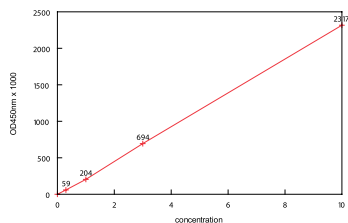
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus Troponin I concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of Troponin I in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 ng/ml	0.05
CAL 2	0.3 ng/ml	0.11
CAL 3	1 ng/ml	0.26
CAL 4	3 ng/ml	0.75
CAL 5	10 ng/ml	2.37



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for Troponin I. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, ng/ml	
	Lower limit	Upper limit
Healthy donors	-	0.5

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 0.25 ng/ml.

11.2. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different Troponin I concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.3. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known Troponin I concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

1. David C Gaze and Paul O Collinson – Multiple molecular forms of circulating cardiac troponin: analytical and clinical significance. *Ann Clin Biochem*, Jul 2008; 45: 349 – 355.
2. Laura Coudrey – The Troponins. *Arch Intern Med*, Jun 1998; 158: 1173 – 1180.

