

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ Д-ДИМЕРУ

12025-300, D-Dimer Test System

Каталог. №: 12025-300

Дата випуску інструкції: 07-10-2020

Кількість : 96

Версія 0

Виробник : Monobind Inc., (США)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1.0 ВВЕДЕННЯ

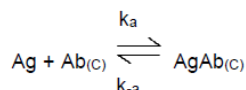
Призначення використання: Кількісне визначення концентрації Д-Димеру в плазмі та сироватці крові людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний послідовний аналіз (ТИП 4):

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіла високої спорідненості та специфічності (ферментні та іммобілізовані) з різним і чітким розпізнаванням епітопів, у надлишку, та нативний антиген. Після змішування буфера для аналізу та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном та нанесеним антитілом, утворюючи комплекс антитіло-антиген. Ця взаємодія проілюстрована нижче:



де $\text{Ab}_{(C)}$ = Нанесене антитіло (надлишкова кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{AgAb}_{(C)}$ = Комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

Після необхідного інкубаційного періоду, пов'язана фракція антиген-антитіло відокремлюється від не пов'язаних антигенів декантацією або промиванням. Додається ще одне антитіло (спрямоване на інший епітоп), мічене ферментом. Інша взаємодія виникає з утворенням на поверхні лунок комплексу, міченого ферментом, антитіло-антиген-нанесене антитіло.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Д-Димеру - 1 мл/флакон

Шість (6) флаконів референсного матеріалу для антигену Д-Димеру з рівнями 0 (A), 100 (B), 400 (C), 1500 (D), 4000 (E) та 10000 (F) нг/мл. Зберігати при температурі 2-8 °C. Додано консервант.

B. Контроль Д-Димеру - 1 мл/флакон

Один (1) флакон референсного контролю для Д-Димеру. Зберігати при температурі 2-8 °C. Додано консервант.

C. Буфер для аналізу - 12 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить буфер, барвник та консерванти. Зберігати при температурі 2-8 °C.

D. Ферментний реагент Д-Димеру - 13 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить моноклональний мишачий IgG, мічений ферментом (HRP) у буфері, барвник та консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

E. Пластина, покрита антитілом Д-Димеру - 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий анти- β hCG мишачими IgG та упакований в алюмінієвий пакет з сушільним агентом. Зберігати при температурі 2-8 °C.

F. Концентрат промивного розчину - 20 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить ПАР у забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

G. Субстрат А - 7 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (ТМВ) у буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C.

H. Субстрат В - 7 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить перексид водню (H_2O_2) у буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C.

I. Стоп-розчин - 8 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при температурі 2-8 °C.

J. Інструкція щодо продукту.

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Не піддавайте реактиви впливу тепла, сонця або сильного світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при температурі 2-8 °C. Стабільність набору та компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Піпетка здатна подавати обсяги 0.025 мл (25 мкл) та 0.50 мл (50 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Дозатор (и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл (100 мкл) та 0.350 мл (350 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикові плівки або кришки для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Набір призначений тільки для діагностики in-vitro

Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах

Всі продукти, що містять сироватку, протестовані методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 2nd Edition, 1988, HHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками повинна бути плазма крові (ЕДТА, Li-гепарин або цитрат можуть бути використані як антикоагулянт) або сироватка за типом, і слід дотримуватися звичайних запобіжних заходів при заборі зразків венепункцією. Щоб уникнути помилкових результатів, зразки крові слід центрифугувати протягом 15 хвилин після забору, а плазму або сироватку слід негайно видалити з еритроцитів.

Зразки плазми можуть зберігатися в холодильнику при температурі 2-8 °C протягом максимум трьох (3) днів. Зразки сироватки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °C протягом чотирнадцяти (14) днів. Якщо зразок (и) не вдається проаналізувати протягом цього часу, зразок (зразки) можуть зберігатися при температурі -20 °C до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування. Для аналізу у двох примірниках потрібно 0.05 мл (50 мкл) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівнях у низькому, нормальному та підвищеному діапазоні для моніторингу результатів аналізу. Ці контроли повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою у відповідному контейнері для зберігання. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

- Розчин робочого субстрату** - стабільний протягом одного року
Влийте вміст бурштинового флакона з розчином «А» у прозорий флакон із розчином «В». Покладіть жовту кришку на прозорий флакон для зручності ідентифікації. Змішайте і позначте відповідно. Зберігати при температурі 2-8 °C.

Примітка 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він виглядає блакитним.

Примітка 2: Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають бактеріальний ріст.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контроли повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

****Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем****

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного матеріалу, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C.
- Внесіть по 0.025 мл (25 мкл) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте 0.100 мл (100 мкл) Буфера для аналізу в усі лунки.
- Закрийте та обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд для змішування.
- Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст мікропланшету шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка пляшка, наповнити кожну лунку до верху (унікайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте 0.100 мл (100 мкл) ферментного реагенту Д-Димеру у всі лунки.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТУ

- Інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі.
- Промийте лунки три (3) рази, виконуючи кроки 6 і 7, як описано вище.
- Додайте 0.100 мл (100 мкл) робочого розчину субстрату у всі лунки (див. Розділ «Підготовка реагенту»). Завжди додайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОБАВЛЕННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте при кімнатній температурі протягом п'ятнадцяти (15) хвилин.
- Додайте 0.050 мл (50 мкл) стоп-розчину в кожну лунку та обережно перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.
- Вимірюйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації Д-Димеру в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть поглинання, отримані з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.

- Відкладіть значення поглинання для кожного сироваткового референсного матеріалу в дублях відповідно до концентрації Д-Димеру в нг/мл на лінійному міліметровому папері (перед тим, як складати графік, не слід усереднювати дублікати референсного матеріалу сироватки).
- Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
- Щоб визначити концентрацію Д-Димеру для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитуйте концентрацію (у нг/мл) з горизонтальної осі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі середня абсорбція (1.761) перетинає криву реакції на дозу при концентрації Д-Димеру 3315 нг/мл (див. Малюнок 1).

Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ELISA, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати його перевірку.

Приклад 1

ID Зразка	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Концентрація (нг/мл)
Калібратор А	A1	0.005	0.004	0
	B1	0.003		
Калібратор В	C1	0.066	0.065	100
	D1	0.065		
Калібратор С	E1	0.290	0.299	400
	F1	0.308		
Калібратор D	G1	0.968	0.977	1500
	H1	0.986		
Калібратор E	A2	2.027	1.982	4000
	B2	1.938		
Калібратор F	C2	2.881	2.848	10000
	D2	2.815		
Контроль 1	E2	0.094	0.098	146
	F2	0.101		
Контроль 2	G2	0.951	0.965	1476
	H2	0.979		
Пацієнт	A3	1.704	1.761	3315
	B3	1.807		

*Дані, наведені в прикладі 1 та на малюнку 1, служать лише для ілюстрації і не повинні використовуватися замість кривої реакції на дозу, підготовленої для кожного аналізу.

Малюнок 1

(Див. в оригіналі інструкції)

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Максимальна Оптична щільність (Калібратор «F») ≥ 1.3
- Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналізу ризиків для цього продукту доступна за запитом від Monobind Inc.

12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.

- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Зразки пацієнтів з концентрацією Д-Димеру понад 10 000 нг/мл можна розводити 1:10 матрицею "0" калібратора або іншою нормальною сироваткою, що містить низький рівень Д-Димеру (< 500 нг/мл), і повторно аналізувати. Концентрацію зразка отримують множенням результату на коефіцієнт розведення та додаванням концентрації Д-Димеру використовуюваного розчинника.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків - згідно з вимогами Директиви 98/79/ЄС IV Маркування IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для процедур тестової системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. "Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays" Clin.Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.
- Monobind не несе відповідальності** за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- Тільки саме значення Д-Димеру не має діагностичного значення**, і його слід використовувати лише разом з іншими клінічними проявами (спостереженнями) та діагностичними процедурами.

13.0 ДІАПАЗОНИ ОЧІКУВАНИХ ЗНАЧЕНЬ

Очікувані рівні Д-Димеру для виключення тромбозів у зразках плазми були отримані з опублікованої літератури.

Існує загальний консенсус щодо наступних даних.

Таблиця 1: Очікувані рівні Д-Димеру плазми

Вік пацієнта	Рівень Д-Димеру для виключення тромбозів
< 50 років	< 500 нг/мл
> 50 років	< Вік x 10 нг/мл

Для отримання референсного діапазону для зразків сироватки крові вимірювали рівні Д-Димеру за допомогою тестової системи D-Dimer AccuBind® у, мабуть, нормальних дорослих різних вікових груп. Отримані значення наведені в таблиці 2.

Таблиця 2: Діапазони Д-Димеру сироватки

Вік пацієнта (роки)	N	Середнє (нг/мл)	Найвище (нг/мл)	Найнижче (нг/мл)
< 50	23	326	1244	137
50-59	19	486	1375	161
60-69	11	467	859	180
70-79	3	440	808	230
80+	3	878	1206	311

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для популяції "нормальних" людей, залежить від безлічі факторів: специфіки методу, сукупності випробуваних пацієнтів та

точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому розташована лабораторія.

14.0 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність в аналізі тестової системи D-Dimer AccuBind® ELISA була визначена шляхом вимірювання шістнадцяти (16) повторень трьох рівнів контрольних пулів пацієнтів у тому самому аналізі. Результати наведені в таблиці 3.

Таблиця 3: Точність в аналізі

Зразок	N	Середнє значення (нг/мл)	σ	CV%
Контроль 1	16	200	10.2	5.1
Контроль 2	16	1934	51.5	2.7
Контроль 3	16	4237	159.8	3.8

Точність між аналізами (загальна точність) тестової системи D-Dimer AccuBind® ELISA була визначена шляхом вимірювання трьох рівнів пулів контролю пацієнтів на трьох різних наборах протягом двох місяців. Результати наведені в таблиці 4.

Таблиця 4: Точність між аналізами

Зразок	N	Середнє значення (нг/мл)	σ	CV%
Контроль 1	24	147	9.3	6.4
Контроль 2	24	1492	96.3	6.5
Контроль 3	24	3352	174.0	5.2

14.2 Чутливість

Тестова система D-Dimer AccuBind® ELISA має чутливість 4.76 нг/мл. Чутливість була встановлена шляхом визначення мінімальності калібратора 0 нг/мл та використання статистики 2σ (95% достовірності) для розрахунку мінімальної дози.

14.3 Достовірність

14.3.1 Лінійність

Лінійність тестової системи D-Dimer AccuBind® ELISA була перевірена шляхом послідовного розведення декількох зразків плазми та сироватки людини, що містять високі рівні Д-Димеру (до 11000 нг/мл), з сироватковим референсним матеріалом «0 нг/мл». Отримані значення були відкладені проти очікуваних значень, і було встановлено, що тест-система має чудову лінійність до 11000 нг/мл із нахилом 0.977 та коефіцієнтом кореляції (R2) 0.998.

14.3.2 Відновлення

До кількох зразків плазми та сироватки людини, що містять низький рівень Д-Димеру (100-700 нг/мл), додавали 100, 400, 1200, 4000 і 8000 нг/мл Д-Димеру та аналізували з Тестовою системою ІФА D-Dimer AccuBind®. Система продемонструвала відмінне відновлення з усіма отриманими значеннями, що не перевищували 15% від очікуваних значень.

14.4 Специфічність

Наступні речовини випробовували на тест-системі D-Dimer AccuBind® ELISA для визначення інтерференції та перехресної реакції. Результати наведені в таблиці нижче.

Речовина	Тестована маса	Інтерференція/реактивність
Фібриноген	4 мг/мл	Відсутність реактивності (< 0.001%)



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

