

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации D-димера в плазме крови человека

(D-димер-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «D-димер-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации D-димера в плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Измерение концентрации D-димера в плазме используется для мониторинга клинического состояния и контроля эффективности лечения при диссеминированном внутрисосудистом свёртывании, тромбозе глубоких вен, тромбозмболии лёгочной артерии и ряде других заболеваний, сопровождаемых тромботическими осложнениями.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 42 исследуемых, 5 калибровочных и одного контрольного образцов в дублях при одновременном использовании всех стрипов планшета или (при трех независимых постановках анализа) – 30 исследуемых, 15 калибровочных и 3 контрольных образцов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном «сэндвич» варианте твердофазного иммуноферментного анализа. В лунки стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами вносятся калибровочные и контрольный образцы с известными кон-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, ст. научным сотрудником НИИ СД С.Е. Гладковой.

1/11

центрациями D-димера, исследуемые образцы плазмы и пероксидазный конъюгат антител к D-димеру.

Образовавшиеся иммунные комплексы «моноклональные антитела – D-димер – конъюгат» после отмывания избытка конъюгата, выявляют ферментативной реакцией с H_2O_2 и раствором тетраметилбензидина. После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом измеряют оптическую плотность растворов в лунках на основной длине волны 450 нм при референсной длине волны 620–650 нм. Допускается измерение только с фильтром 450 нм.

Степень окрашивания пропорциональна концентрации D-димера в анализируемом образце. Концентрация D-димера в анализируемых образцах рассчитывается на основании калибровочного графика.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов, «люмающихся» по 1 лунке) с иммобилизованными на внутренней поверхности антителами к D-димеру, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества D-димера – 0; 130; 260; 520; 1500 нг/мл, аттестованные относительно набора реагентов Technozym D-Dimer ELISA (фирма Technoclone GmbH, Австрия, РУ № ФСЗ 2010/06468); концентрации D-димера в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, лиофилизированные – 5 флаконов;
- контрольный образец с известным содержанием D-димера, лиофилизированный – 1 флакон;
- конъюгат моноклональных антител к D-димеру с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (12 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл);

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночкой для реагентов – 2 шт.;

- наконечниками для пипеток на 5 – 200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Специфичность анализа обеспечивается использованием моноклональных антител, обладающих высокой специфичностью к D-димеру.

3.2. Использование в наборе реагентов специфических блокирующих агентов исключает возможность получения ложноположительных результатов в плазме крови, содержащей гетерофильные, в том числе антимышьиные (НАМА), антитела.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания D-димера в одном и том же образце плазмы крови с использованием набора D-димер-ИФА-БЕСТ не превышает 8%.

3.4. Линейность. Отклонение от расчетной величины концентраций D-димера в образцах плазмы крови при разведении их плазмой крови, не содержащей D-димер, не превышает 10 % в диапазоне концентраций: 130 - 1500 нг/мл.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации D-димера, предписанной в образце, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 260 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.6. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация D-димера не превышает 10 нг/мл.

3.7. «Хук»-эффект высоких концентраций.

«Хук»-эффект отсутствует в диапазоне концентраций D-димера от 0 до 6000 нг/мл.

3.8. Клиническая проверка. Концентрация D-димера, измеренная в плазме крови у 80% здоровых доноров (n=288) находилась в диапазоне 0–250 нг/мл, а у 97% – в диапазоне 0–285 нг/мл.

3.9. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации D-димера, соответствующие нормальным у здоровых людей для данного региона.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае

попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 1000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 300 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °С и 400-800 об/мин;
- флаконы стеклянные вместимостью 30 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 мл;
- колбы вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для анализа используется цитратная плазма крови человека. На один анализ требуется 10 мкл плазмы крови. Получение плазмы: смешать 9 частей венозной крови с 1 частью 0,11 М цитрата натрия и центрифугировать 15 мин при 2500 об/мин. Не использовать образцы сыворотки!

6.2. Подготовленные образцы можно хранить в течение 3 ч при температуре от 18 до 25°С или 24 ч при температуре от 2 до 8°С; для более длительного хранения образцы необходимо заморозить немедленно после центрифугирования. При необходимости образцы плазмы можно хранить при минус 20°С в течение 6 месяцев. После размораживания образцы следует тщательно перемешать, осадок отделить центрифугированием. Избегать повторных циклов замораживания/оттаивания.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и анализируемые образцы выдерживать при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочного раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.4. Подготовка калибровочных и контрольного образцов

Готовить непосредственно перед проведением анализа!

Для восстановления необходимо добавить в каждый флакон с лиофилизированным образцом по 150 мкл дистиллированной воды, оставить не менее чем на 5 минут для полного растворения и аккуратно перемешать, избегая пенообразования.

Восстановленные образцы можно хранить при температуре минус 20 в течение всего срока годности.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
1	2,0	До 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ плас готов к использованию.

Необходимое количество раствора тетраметилбензидина отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента и поместить в защищенное от света место.

Остатки раствора тетраметилбензидина из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором тетраметилбензидина).

Раствор тетраметилбензидина после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Необходимо исключить воздействие света на раствор тетраметилбензидина.

7.7. Внести в соответствующие лунки в дублях по 10 мкл каждого из калибровочных образцов и по 10 мкл контрольного образца. В лунки, предназначенные для анализируемых образцов в дублях по 10 мкл исследуемых образцов.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин.

7.8. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые накопечники.

7.9. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин в термостатируемом шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ с частотой 700 об/мин.

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3). При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании каждой промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см п. 7.6). Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в термостатируемом шейкере при температуре 37°C в течение 15 мин с частотой 700 об/мин.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые накопечники.

7.12. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение только с фильтром 450 нм.

Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

- ОП_{ср} калибровочного образца 0 нг/мл не должна быть выше 0,2 ед. опт. плотн.;
- ОП_{ср} калибровочного образца 1500 нг/мл должна быть не ниже 0,9 ед. опт. плотн.,

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от заданной концентрации D-димера в калибровочных образцах (нг/мл). Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации D-димера в контрольных образцах.

9.3. Определить содержание D-димера в контрольных образцах и анализируемых пробах по калибровочному графику.

9.4. Если значение оптической плотности образца превышает значения ОП для калибровочного образца 1500 нг/мл, то данный образец анализируют повторно после дополнительного разведения раствором для разведения образцов в 10 раз (например, к 90 мкл РРО добавить 10 мкл анализируемого образца), полученные для образцов результаты умножаются на 10.

9.5. Контрольный образец служит для проверки достоверности результатов анализа. Измеренные значения концентрации D-димера в контрольном образце не должны выходить за пределы интервалов, указанных на этикетке флакона и в паспорте. В этом случае результаты анализа можно считать достоверными.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

10. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

В процессе свертывания крови под действием тромбина в плазме образуется растворимый фибрин, который связывается со стенками сосудов и преобразуется в сгусток и тромб. Образование тромба немедленно провоцирует фибринолиз с участием пламина. Под действием пламина расщепляется как фибрин, так и фибриноген, но D-димер образуется только из фибрина, являясь наиболее специфичным маркером деградации фибриновых сгустков. Конечные продукты деградации фибрина представляют собой довольно стабильные фрагменты, что позволяет проводить диагностику с наибольшей точностью. Увеличение концентрации D-димера чётко и однозначно свидетельствует об активации фибринолиза, чему, в свою очередь, обязательно предшествует тромбонемия и избыточное образование нерастворимого фибрина (тромба). Таким образом, поскольку процессы образования и распада фибрина жёстко сопряжены, врач по интенсивности фибринолиза (фактически – по уровню D-димера в крови!) может эффективно оценить интенсивность и характер тромбообразования.

Повышение содержания D-димера в плазме крови свидетельствует об активации процессов свертывания крови в результате повреждения тканей или в результате развития заболеваний, вызывающих тромботические осложнения. Негативные результаты теста на D-димер, напротив, позволяют с высокой вероятностью исключить наличие таких заболеваний.

Повышенные уровни D-димера характерны при тромбозе глубоких вен (ТГВ), при тромбозмболии легочной артерии (ТЭЛА), при диссеминированном внутрисосудистом свертывании (ДВС) крови, при различных травмах. Физиологическое увеличение содержания D-димера в крови наблюдается при беременности; при этом, слишком высокие уровни могут указывать на осложнения беременности и на опасность развития ДВС-синдрома. С возрастом содержание D-димера тоже обычно увеличивается. По изменению его уровня в проблемных группах риска можно судить о вероятности развития инсульта и инфаркта.

Определение D-димера показано также для ранней диагностики фибринолитических процессов (претромботический риск), в мониторинге тромболитической терапии, при злокачественных новообразованиях и хирургических вмешательствах.

Негативные результаты теста на D-димер могут иметь чрезвычайно высокую отрицательную прогностическую значимость. Так, нормальный уровень D-димера на фоне соответствующей клинической картины позволяет с высокой степенью вероятности исключить венозную тромбоэмболию и ДВС-синдром.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

11.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

11.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- калибровочные образцы, контрольный образец после восстановления необходимо хранить в плотно закрытых флаконах при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности;

- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения образцов, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- конъюгат можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

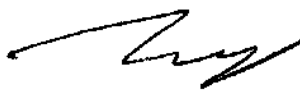
11.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «D-димер-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30

Ст. научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



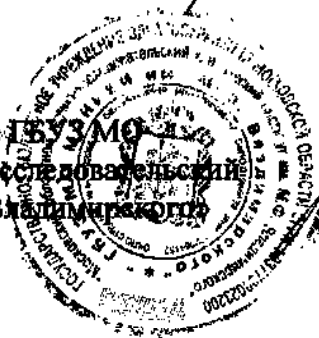
С.Е. Гладкова

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



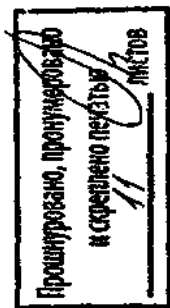
М.Ю. Рукавишников

Зам. директора по научной работе
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»



В.И. Шумский





УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

_____ М.Д. Хусанов

«15» _____ 2013 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации D-димера в плазме крови человека
(D-димер-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «D-димер-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации D-димера в плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Измерение концентрации D-димера в плазме используется для мониторинга клинического состояния и контроля эффективности лечения при диссеминированном внутрисудистом свёртывании, тромбозе глубоких вен, тромбозмболии лёгочной артерии и ряде других заболеваний, сопровождаемых тромботическими осложнениями.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа 42 исследуемых, 5 калибровочных и одного контрольного образцов в дублях при одновременном использовании всех стрипов планшета или (при трех независимых постановках анализа) – 30 исследуемых, 15 калибровочных и 3 контрольных образцов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном «сэндвич» варианте твердофазного иммуноферментного анализа. В лунки стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами вносятся калибровочные и контрольный образцы с известными кон-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, ст. научным сотрудником НИИ СД С.Е. Гладковой.

10

центрациями D-димера, исследуемые образцы плазмы и пероксидазный конъюгат антител к D-димеру.

Образовавшиеся иммунные комплексы «моноклональные антитела – D-димер – конъюгат» после отмывания избытка конъюгата, выявляют ферментативной реакцией с H_2O_2 и раствором тетраметилбензидина. После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом измеряют оптическую плотность растворов в лунках на основной длине волны 450 нм при референсной длине волны 620–650 нм. Допускается измерение только с фильтром 450 нм.

Степень окрашивания пропорциональна концентрации D-димера в анализируемом образце. Концентрация D-димера в анализируемых образцах рассчитывается на основании калибровочного графика.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов, «ломающихся» по 1 лунке) с иммобилизованными на внутренней поверхности антителами к D-димеру, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества D-димера – 0; 130; 260; 520; 1500 нг/мл, аттестованные относительно набора реагентов Technozym D-Dimer ELISA (фирма Technoclone GmbH, Австрия, РУ № ФСЗ 2010/06468); концентрации D-димера в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, лиофилизированные – 5 флаконов;
- контрольный образец с известным содержанием D-димера, лиофилизированный – 1 флакон;
- конъюгат моноклональных антител к D-димеру с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (12 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночкой для реагентов – 2 шт.;

- наконечниками для пипеток на 5 – 200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Специфичность анализа обеспечивается использованием моноклональных антител, обладающих высокой специфичностью к D-димеру.

3.2. Использование в наборе реагентов специфических блокирующих агентов исключает возможность получения ложноположительных результатов в плазме крови, содержащей гетерофильные, в том числе антимышьиные (НАМА), антитела.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания D-димера в одном и том же образце плазмы крови с использованием набора D-димер-ИФА-БЕСТ не превышает 8%.

3.4. Линейность. Отклонение от расчетной величины концентраций D-димера в образцах плазмы крови при разведении их плазмой крови, не содержащей D-димер, не превышает 10 % в диапазоне концентраций: 130 - 1500 нг/мл.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации D-димера, предписанной в образце, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 260 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.6. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация D-димера не превышает 10 нг/мл.

3.7. «Хук»-эффект высоких концентраций.

«Хук»-эффект отсутствует в диапазоне концентраций D-димера от 0 до 6000 нг/мл.

3.8. Клиническая проверка. Концентрация D-димера, измеренная в плазме крови у 80% здоровых доноров (n=288) находилась в диапазоне 0–250 нг/мл, а у 97% – в диапазоне 0–285 нг/мл.

3.9. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации D-димера, соответствующие нормальным у здоровых людей для данного региона.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае

попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 1000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 300 мкл;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °C и 400-800 об/мин;
- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы стеклянные вместимостью 10-15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 мл;
- колбы вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для анализа используется цитратная плазма крови человека. На один анализ требуется 10 мкл плазмы крови. Получение плазмы: смешать 9 частей венозной крови с 1 частью 0,11 М цитрата натрия и центрифугировать 15 мин при 2500 об/мин. Не использовать образцы сыворотки!

6.2. Подготовленные образцы можно хранить в течение 3 ч при температуре от 18 до 25°C или 24 ч при температуре от 2 до 8°C; для более длительного хранения образцы необходимо заморозить немедленно после центрифугирования. При необходимости образцы плазмы можно хранить при минус 20°C в течение 6 месяцев. После размораживания образцы следует тщательно перемешать, осадок отделить центрифугированием. Избегать повторных циклов замораживания/оттаивания.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и анализируемые образцы выдерживать при температуре от 18 до 25 °C не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °C до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочного раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.4. Подготовка калибровочных и контрольного образцов

Готовить непосредственно перед проведением анализа!

Для восстановления необходимо добавить в каждый флакон с лиофилизированным образцом по 150 мкл дистиллированной воды, оставить не менее чем на 5 минут для полного растворения и аккуратно перемешать, избегая пенообразования.

Восстановленные образцы можно хранить при температуре минус 20 в течение всего срока годности.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
1	2,0	До 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора тетраметилбензидина отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента и поместить в защищенное от света место.

Остатки раствора тетраметилбензидина из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором тетраметилбензидина).

Раствор тетраметилбензидина после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Необходимо исключить воздействие света на раствор тетраметилбензидина.

7.7. Внести в соответствующие лунки в дублях по 10 мкл каждого из калибровочных образцов и по 10 мкл контрольного образца. В лунки, предназначенные для анализируемых образцов в дублях по 10 мкл исследуемых образцов.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин.

7.8. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники.

7.9. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин в термостатируемом шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ с частотой 700 об/мин.

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3). При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании каждой промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см п. 7.6). Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в термостатируемом шейкере при температуре 37°C в течение 15 мин с частотой 700 об/мин.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

7.12. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение только с фильтром 450 нм.

Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

- $ОП_{ср}$ калибровочного образца 0 нг/мл не должна быть выше 0,2 ед. опт. плотн.;
- $ОП_{ср}$ калибровочного образца 1500 нг/мл должна быть не ниже 0,9 ед. опт. плотн.,

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от заданной концентрации D-димера в калибровочных образцах (нг/мл). Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации D-димера в контрольных образцах.

9.3. Определить содержание D-димера в контрольных образцах и анализируемых пробах по калибровочному графику.

9.4. Если значение оптической плотности образца превышает значения ОП для калибровочного образца 1500 нг/мл, то данный образец анализируют повторно после дополнительного разведения раствором для разведения образцов в 10 раз (например, к 90 мкл РРО добавить 10 мкл анализируемого образца), полученные для образцов результаты умножаются на 10.

9.5. Контрольный образец служит для проверки достоверности результатов анализа. Измеренные значения концентрации D-димера в контрольном образце не должны выходить за пределы интервалов, указанных на этикетке флакона и в паспорте. В этом случае результаты анализа можно считать достоверными.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

10. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

В процессе свертывания крови под действием тромбина в плазме образуется растворимый фибрин, который связывается со стенками сосудов и преобразуется в сгусток и тромб. Образование тромба немедленно провоцирует фибринолиз с участием плазмина. Под действием плазмина расщепляется как фибрин, так и фибриноген, но D-димер образуется только из фибрина, являясь наиболее специфичным маркером деградации фибриновых сгустков. Конечные продукты деградации фибрина представляют собой довольно стабильные фрагменты, что позволяет проводить диагностику с наибольшей точностью. Увеличение концентрации D-димера чётко и однозначно свидетельствует об активации фибринолиза, чему, в свою очередь, обязательно предшествует тромбонемия и избыточное образование нерастворимого фибрина (тромба). Таким образом, поскольку процессы образования и распада фибрина жёстко сопряжены, врач по интенсивности фибринолиза (фактически – по уровню D-димера в крови!) может эффективно оценить интенсивность и характер тромбообразования.

Повышение содержания D-димера в плазме крови свидетельствует об активации процессов свертывания крови в результате повреждения тканей или в результате развития заболеваний, вызывающих тромботические осложнения. Негативные результаты теста на D-димер, напротив, позволяют с высокой вероятностью исключить наличие таких заболеваний.

Повышенные уровни D-димера характерны при тромбозе глубоких вен (ТГВ), при тромбозмболии легочной артерии (ТЭЛА), при диссеминированном внутрисосудистом свертывании (ДВС) крови, при различных травмах. Физиологическое увеличение содержания D-димера в крови наблюдается при беременности; при этом, слишком высокие уровни могут указывать на осложнения беременности и на опасность развития ДВС-синдрома. С возрастом содержание D-димера тоже обычно увеличивается. По изменению его уровня в проблемных группах риска можно судить о вероятности развития инсульта и инфаркта.

Определение D-димера показано также для ранней диагностики фибринолитических процессов (претромботический риск), в мониторинге тромболитической терапии, при злокачественных новообразованиях и хирургических вмешательствах.

Негативные результаты теста на D-димер могут иметь чрезвычайно высокую отрицательную прогностическую значимость. Так, нормальный уровень D-димера на фоне соответ-

ствующей клинической картины позволяет с высокой степенью вероятности исключить венозную тромбоэмболию и ДВС-синдром.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

11.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

11.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- калибровочные образцы, контрольный образец после восстановления необходимо хранить в плотно закрытых флаконах при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения образцов, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;
- конъюгат можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

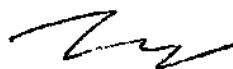
11.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «D-димер-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30

Ст. научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



С.Е. Гладкова

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

Начальник управления по науке,
инновациям и информатизации ГБОУ
ВПО НГМУ
Минздрава России



М.Ф. Осипенко



Прошу _____, пронумеровано _____
и скреплено печатью _____
_____ листов