«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«___» _____ 2022 г.
м.п.

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольный и калибровочные образцы. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном «сэндвич» варианте твердофазного иммуноферментного анализа. В лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами вносятся калибровочные и контрольный образцы с известными концентрация-ми D-димера, исследуемые образцы плазмы и пероксидазный конъюгат антител к D-димеру. Образовавшиеся иммунные комплексы «моноклональные антитела – D-димер – конъюгат» после отмывки избытка конъюгата, выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии тетраметилбензидина. После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом измеряют оптическую плотность растворов в лунках. Степень окрашивания пропорциональна концентрации D-димера в образце. Концентрация D-димера в анализируемых образцах рассчитывается на основании калибровочного графика.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) *Описание*	Кол-во
Планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к D-димеру	1 шт.
Калибровочные образцы* (К0, К1, К2, К3, К4) *Содержат известные количества D-димера – 0; 250; 750; 1500; 3000 нг/мл, лиофилизированные.*	5 фл.
Контрольный образец *Содержит D-димер в пределах, указанных в паспорте и на этикетке флакона, нг/мл, лиофилизированный.*	1 фл.
Конъюгат моноклональных антител к D-димеру с пероксидазой хрена. *Содержит натрия мертиолят (0,001%), ProClin 300 (0,027%), ProClin 150 (0,0048%), фенол (0,005%).*	1 фл., 13,0 мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Раствор для разведения образцов (РРО)	1 фл., 12,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раст-вора с твином (ФСБ-Т×25) *Содержит ProClin 300 (0,25%).*	1 фл., 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) *Содержит 3,3',5,5' – тетраметилбензидин (0,1%).*	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент *Содержит кислоту серную (4,9%).*	1 фл., 12,0 мл
Пленки для заклеивания планшета	2 шт.
Наконечники для дозаторов на 2–200 мкл	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.
Трафарет для построения калибровочного графика	1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.** Воспроизводимость – коэффициент вариации не превышает 8%.

3.2.** Линейность в диапазоне концентраций D-димера 250–3000 нг/мл – в пределах 90–110%.

3.3.** Тест на «открытие» – в пределах 90–110%.

3.4.** Аналитическая чувствительность – минимально определяемая концентрация D-димера не превышает 10 нг/мл.

3.5. Нормальное значение концентрации D-димера в плазме не превышает 250 нг/мл.

Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации D димера, соответствующие нормальным для данного региона.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Стоп-реагент и раствор ТМБ плюс обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора ТМБ плюс на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 300, ProClin 150, фенол, кислоту серную, натрия мертиолят, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2. «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольным 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.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемио-логические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– термостатируемый шейкер орбитального типа, поддерживающий температуру (37±1)°С, с интенсивностью перемешивания 700 об/мин;
– промывочное устройство для планшетов;
– холодильник бытовой;
– дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
– дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 до 300 мкл;
– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
– флаконы вместимостью 15 мл;
– вода дистиллированная;
– перчатки медицинские диагностические одноразовые;
– бумага фильтровальная лабораторная;
– дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

6.2. Для анализа использовать образцы плазмы крови, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия.

Не использовать для анализа сыворотку крови!

6.3. Образцы плазмы крови хранить при температуре (18–26)°С не более 3 часов, при температуре (2–8)°С не более 24 часов или при температуре минус 18°С и ниже, если требуется более длительное хранение. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы плазмы крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. *Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.*

– Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18–26)°С не менее 30 мин.

– При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами (кроме калибровочных и контрольного образцов) хранить при температуре (2–8)°С, использовать в течение всего срока годности. Допускается хранение ФСБ-Т×25 и стоп-регента при температуре (2–30)°С. Флаконы с калибровочными и контрольным образцами после восстановления хранить только в замороженном состоянии при температуре –18°С и ниже, в течение всего срока годности набора.

– Необходимо избегать воздействия прямого солнечного света на раствор ТМБ плюс при подготовке и проведении ИФА.

– При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, раствор ТМБ плюс, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

– Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

– При использовании автоматического устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% этиловом спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.

– Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

– В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ плюс ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом, а затем дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

– Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей необходимо прогреть его при температуре (30–40)°С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора) внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (2–8)°С не более 1 месяца или при (18–26)°С не более 7 дней.

7.4. Калибровочные и контрольный образцы.

Готовить непосредственно перед проведением анализа!

В каждый флакон с лиофилизованными калибровочными и контрольным образцами добавить по 150 мкл дистиллированной воды, выдержать в течение 10 минут и тщательно перемешать пипетированием, избегая образования пены. Сразу после отбора необходимого количества образцов (восстановленных либо размороженных) флаконы тщательно закрыть и поместить в морозильную камеру. Допускается не более 5 циклов замораживания/оттаивания.

7.5. Конъюгат.

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

7.6. Раствор ТМБ плюс.

*Раствор ТМБ плюс готов к использованию.*В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

7.7. Стоп-реагент.

Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 10 мкл каждого калибровоч-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ного образца и по 10 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 10 мкл анализируемых образцов плазмы крови.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин.

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

Стрипы заклеить пленкой и инкубировать 60 мин при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре (37±1)°С с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

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

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см п. 7.6.).

Стрипы заклеить пленкой и инкубировать 15 мин при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре (37±1)°С с интенсивностью перемешивания 700 об/мин

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

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8.6. Измерить величину оптической плотности (ОП) растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение при одной длине волны – 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации D-димера в калибровочных образцах (нг/мл). Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

9.2. Определить концентрацию D-димера в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Значение концентрации D-димера в контрольном образце должно попадать в пределы, указанные на этикетке флакона.

9.3. Если значение оптической плотности образца превышает значения ОП для калибровочного образца К4, то данный образец анализируют повторно после дополнительного разведения раствором для разведения образцов в 2,4,8 раз. Дополнительные разведения выполнять в отдельной чистой пробирке при тщательном перемешивании анализируемого образца и РРО, затем повторить анализ и полученный для данного образца результат умножить на величину дополнительного разведения (2,4,8).

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8)°С. Допускается транспортирование при температуре до 26°С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре (2–8)°С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

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

630559, Новосибирская область,
р.п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, 227-75-41.
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

1. Расчет результатов анализа

По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) в лунках с анализируемыми образцами.

Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации D-димера (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

Определить концентрацию D-димера в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации D-димера в образце.

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

- $ОП_{ср.}$ калибровочного образца К4 должна быть не ниже 0,9 ед. опт. плотн.
- Соотношение значений оптических плотностей калибровочных образцов К0, К1, К2, К3, К4: $ОП_{К0} < ОП_{К1} < ОП_{К2} < ОП_{К3} < ОП_{К4}$.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации D-димера в плазме, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

2. Единицы измерения концентрации D-димера

В мировой лабораторной практике встречается 2 вида представления концентрации D-димера – в виде собственно концентрации D-димера (или единиц D-димера/DDU – D-Dimer Unit); либо в виде концентрации D-димера в фибриноген-эквивалентных единицах (ФЭУ / FEU). При этом 1 нг/мл D-димера в DDU соответствует 2 нг/мл D-димера в ФЭУ. В наборе «D-димер-ИФА-БЕСТ» используются калибраторы на основе очищенного D-димера, поэтому получаемые с помощью набора значения концентрации, являются концентрацией D-димера в DDU.

При использовании набора реагентов «D-димер-ИФА-БЕСТ» концентрация D-димера 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 DDU. Полученные значения вполне согласуются с литературными данными. Тем не ме-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

нее, каждой лаборатории рекомендуется получить применительно к набору собственные референсные значения.

3. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «D-димер-ИФА-БЕСТ»

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести: по 10 мкл калибровочных и контрольного образцов в дублях;
по 10 мкл анализируемых образцов в дублях.

Внести: по 100 мкл конъюгата.

Инкубировать: 60 мин, 37°С, 700 об/мин.

Промыть: промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл раствора ТМБ плюс.

Инкубировать: 15 мин, 37°С, 700 об/мин.

Внести: по 100 мкл стоп-реагента.

Измерить: ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

4. Графические символы

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ n	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до …		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил. вода, мл		
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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

12	24,0	до 600	12,0	12,0

* Калибровочные образцы набора реагентов «D-димер-ИФА-БЕСТ» аттестованы относительно набора реагентов Technozym D-Dimer ELISA (фирма Technoclone GmbH, Австрия, РУ № ФСЗ 2010/06468).

** по ГОСТ Р 51352-2013.

Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации D-димера в калибровочных образцах.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru