

کیت اندازه گیری D-Dimer در پلاسمای انسان به روش الایزا
D-Dimer ELISA Kit 96t
Cat. No: 8424-96 / Rev: B3 (1404/09/08)

مقدمه:

پروتئین D-Dimer با جرم مولکولی تقریبی ۱۸۰ کیلودالتون، محصول تخریب آنزیمی فیبرین (فیبرینولیز) توسط آنزیم پلازمین است که در اثر تجزیه لخته خون در عروق بدن تولید می شود. اندازه گیری غلظت D-Dimer در تشخیص انعقاد داخل عروقی منتشر (DIC)، ترومبوز سیاهرگی عمقی (DVT) و آمبولی ریه (PE) اهمیت دارد. همچنین، ارتباط مستقیم بین افزایش معنی دار غلظت D-Dimer و میزان مرگ و میر در افراد مبتلا به بیماری COVID-19 مشخص شده است. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی غلظت D-Dimer در نمونه پلاسمای انسان به روش الایزا است و نتایج مربوط به این کیت با واحد ng/mL گزارش می شود.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. با انکوباسیون نمونه و آنتی بادی مونوکلونال بیوتینیله ضد D-Dimer در چاهک های پوشیده شده با استرپتاویدین، کمپلکس های ایمنی در کف چاهک ها ایجاد می شوند. پس از شستشوی چاهک ها و حذف اجزاء متصل نشده، با افزودن کونژوگ آنزیمی (حاوی آنتی بادی مونوکلونال متصل به آنزیم HRP) کمپلکس های ایمنی تشکیل می شوند. با شستشوی مجدد چاهک ها، افزودن محلول رنگزا (سوبسترای HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. مقدار رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت D-Dimer موجود در هر چاهک ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت D-Dimer نمونه به کمک منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) مجموعه کالیبراتورها (D-Dimer Cal. A-F): شش ویال با غلظت های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۱۵۰۰، ۴۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ ng/mL تهیه شده از نمونه انسانی.

۳) کونژوگ آنزیمی (D-Dimer Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی ضد D-Dimer متصل به آنزیم HRP.

۴) کونژوگ بیوتینی (D-Dimer Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی ضد D-Dimer متصل به بیوتین.

۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.

۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.

۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.

۸) محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.

۹) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): ویال ۰/۵ میلی لیتری.

۱۰) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): ویال ۰/۵ میلی لیتری.

۱۱) بر چسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه ۱: تمام محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل ها در COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
۲) سمپلر کالیبره.
۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است لذا از استفاده مشترک با سایر کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های ایمنی انجام شوند.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود و از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.

۶) نمونه بیماران، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه های پلاسما را با استفاده از ضد انعقاد سیترات (پلاسمای مورد استفاده در آزمایش PT/PTT) تهیه کنید. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود. سانتریفیوژ خون باید حداکثر ۱۵ دقیقه پس از خون گیری انجام شود. بلافاصله پس از سانتریفیوژ، پلاسما را از سلول های خونی جدا کنید. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها را می توان تا ۴ ساعت در دمای اتاق و ۳ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری نمایید.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود.

در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

۲) آماده سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه ها و یا کنترل ها را در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگ بیوتینی به همه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگ آنزیمی به همه چاهک ها اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

¹ <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

علامت استفاده شده در پرچسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	153	3143	1648	1674	101.5
2	1566	152	859	835	97.2
3	3141	1561	2351	2403	102.2

۴) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۴/۶ ng/mL تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SDs}$$

$$\text{LOB} = \text{Meanb} + 1.645 \text{ SDb}$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۵) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای D-Dimer

شرکت تولیدکننده کیت، براساس نتایج حاصل از کیت حاضر و اطلاعات گزارش شده در مقالات علمی معتبر مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Normal Range	UP TO 600 ng/mL
--------------	-----------------

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (ng/mL)	156	1256	2953
SD (ng/mL)	8	55	83
CV (%)	5.1	4.4	2.8

۲) بررسی دقت - آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (ng/mL)	164	1328	2846
SD (ng/mL)	9	65	89
CV (%)	5.5	4.9	3.1

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این تست به اژه هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، غلظت D-Dimer در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

۷) چاهک‌ها را با پرچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۸) چاهک‌ها را مطابق با بند ۵ شستشو دهید.

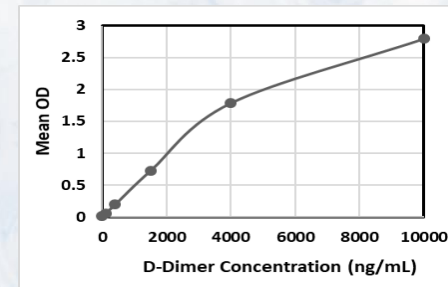
۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۱۱) مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از امتد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.015	0.017	0
	B1	0.019		
Cal. B	C1	0.049	0.053	100
	D1	0.057		
Cal. C	E1	0.185	0.192	400
	F1	0.199		
Cal. D	G1	0.713	0.721	1500
	H1	0.729		
Cal. E	A2	1.773	1.786	4000
	B2	1.799		
Cal. F	C2	2.789	2.795	10000
	D2	2.801		



References:

1. Johnson ED, Schell JC, Rodgers GM. The D-Dimer assay. American Journal of Hematology. 94: 833-839.2019.
2. Urban K, Kirlaly K, Stevermer JJ. It's time to use an age-based approach to D-dimer. The Journal of Family Practice. 63(3): 155-158.2014.
3. Weitz JI, Fredenburgh JC, Eikelboom JW. A Test in Context: D-Dimer. Journal of the American College of Cardiology 70(19):2411-2420.2017.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با تلفن‌های مندرج بر روی جعبه بخش پشتیبانی تماس بگیرید.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های الایزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.