# MONOKIT

**کیت اندازه‌گیری D-Dimer در پلاسمای انسان به روش الایزا**
**D-Dimer ELISA Kit 96t**
Cat. No: 8434-96 / Rev: A1 (1402/09/25)

**مقدمه:**

پروتئین D-Dimer با جرم مولکولی تقریبی ۱۸۰ کیلودالتون، محصول تخریب آنزیمی فیبرین (فیبرینولیز) توسط آنزیم پلاسمین است که در اثر تجزیه لخته خون در عروق بدن تولید می‌شود. اندازه‌گیری 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 معنی‌دار غلظت D-Dimer و میزان مرگ و میر در افراد مبتلا به بیماری COVID-19 مشخص شده است. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی غلظت D-Dimer در نمونه پلاسمای انسان به روش الایزا است و نتایج مربوط به این کیت با واحد ng/mL گزارش می‌شود.

**اصول آزمایش:**

این آزمایش بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. با انکوباسیون نمونه و آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیله ضد D-Dimer در چاهک‌های پوشیده شده با استرپتاویدین، کمپلکس‌های ایمنی در کف چاهک‌ها ایجاد می‌شوند. پس از شستشوی چاهک‌ها و حذف اجزاء متصل نشده، با افزودن کونژوگه آنزیمی (حاوی آنتی‌بادی مونوکلونال متصل به آنزیم HRP) کمپلکس‌های ایمنی تشکیل می‌شوند. با شستشوی مجدد چاهک‌ها، افزودن محلول رنگزا (سوبسترای HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول‌موج 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 می‌گردد.

**محتویات کیت:**

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) مجموعه کالیبراتورها (D-Dimer Cal. A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۴۰۰، ۱۵۰۰، ۴۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ ng/mL، تهیه شده از نمونه انسانی.
۳) کونژوگه آنزیمی (D-Dimer Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد D-Dimer متصل به آنزیم HRP.
۴) کونژوگه بیوتینی (D-Dimer Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد D-Dimer متصل به بیوتین.
۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۹) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۰) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۱) بر چسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه ۱: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
توجه ۲: مقادیر کنترل‌ها در برگه COA درج شده است.

**مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:**

۱) دستگاه خوانش‌گر 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 کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های 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، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

**جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:**

۱) نمونه‌های پلاسما را با استفاده از ضد انعقاد سیترات (پلاسمای مورد استفاده در آزمایش PT/PTT) تهیه کنید. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود. سانتریفیوژ خون باید حداکثر ۱۵ دقیقه پس از خون‌گیری انجام شود. بلافاصله پس از سانتریفیوژ، پلاسما را از سلول‌های خونی جدا کنید. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها را می‌توان تا ۴ ساعت در دمای اتاق و ۳ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

**آماده سازی و نگهداری معرف‌ها:**

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. درصورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. 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 نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.
۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و یا کنترل‌ها را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۵) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.
۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
۷) چاهک‌ها را با برچسب 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.

1. http://www.samantajhiz.com/Support.aspx

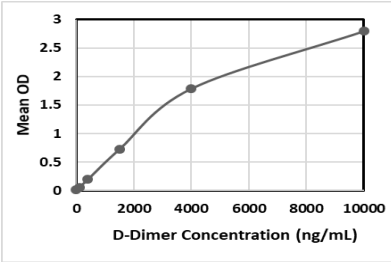
ISO13485 KGS

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ 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 طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول‌موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

| Calibrators | Well Number | OD | Mean OD | Conc. (ng/mL) |
|---|---|---|---|---|
| Cal. A | A1 | 0.017 | 0.019 | 0 |
| | B1 | 0.021 | | |
| Cal. B | C1 | 0.054 | 0.058 | 100 |
| | D1 | 0.062 | | |
| Cal. C | E1 | 0.202 | 0.209 | 400 |
| | F1 | 0.216 | | |
| Cal. D | G1 | 0.785 | 0.793 | 1500 |
| | H1 | 0.801 | | |
| Cal. E | A2 | 1.948 | 1.961 | 4000 |
| | B2 | 1.974 | | |
| Cal. F | C2 | 2.793 | 2.799 | 10000 |
| | D2 | 2.805 | | |




### 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) | 181 | 1450 | 3015 |
| SD (ng/mL) | 9 | 65 | 91 |
| CV (%) | 5 | 4.5 | 3.0 |

**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) | 141 | 1415 | 2918 |
| SD (ng/mL) | 8 | 69 | 92 |
| CV (%) | 5.7 | 4.9 | 3.1 |

**۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)**

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

| No. | Sample (ng/mL) | Added (ng/mL) | Exp. (ng/mL) | Obs. (ng/mL) | % Rec. |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 183 | 3433 | 1808 | 1835 | 101.5 |
| 2 | 1601 | 185 | 893 | 857.5 | 96.0 |
| 3 | 3435 | 1603 | 2519 | 2588.5 | 102.7 |

**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 ۴/۶۲ng/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645\ SDs$$
$$LOB = Meanb + 1.645\ SDb$$

(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 به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

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

**علائم استفاده شده در برچسب کالاها**

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

**References:**


1. Johnson ED, Schell JC, Rodgers GM. The D-Dimer assey. American Journal of Hematology. 94: 833-839.2019.
2. Urban K, Kirlely 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.


www.samantajhiz.com

تهران- بزرگراه آبشناسان- سردارجنگل شمالی- خیابان پنج تن- بلوار قدس- کوچه دوم شرقی- پلاک ۸

تلفن : ۰۲۱۸۵۵۱۸۰۰۰