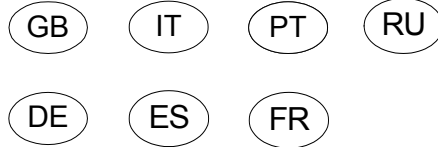





# TECHNOZYM<sup>®</sup> D-Dimer ELISA



For research  
use only

REF 2599006 TECHNOZYM<sup>®</sup> D-Dimer ELISA



symbols key / Symbolschlüssel / interpretazione dei simboli / explicación de símbolos / explicação dos símbolos / clé des symboles / Symbolnyckel / symbolforklaring / Tegnforklaring / Κλειδί συμβόλων / Използвани символи / символы / Klíčova slova / Značenje simbola	
	manufacturer / Hersteller / fabbricante / fabricante / fabricante / fabricant / Tillverkaren / Fabrikanten / Produzent / Κατασκευαστής / Производитель / Производител / výrobce / Proizvođač
	storage temperature / Lagertemperatur / temperatura di conservazione / temperatura de conservación / temperatura de conservação / température de stockage / lagringstemperatur / opbevaringstemperatur / Oppbevaringstemperatur / θερμοκρασία αποθήκευσης / съхранение на / teplota skladování / температура хранения / teplota skladování / Temperatura lagerovanja
	 determinations / Bestimmungen / determinazioni / determinaciones / determinações / déterminations / bestämmingar / bestemmelser / Bestemmelser / προσδιορισμοί / брой тестове / stanovení / определенний / роčet stanovení / Definicija
<b>AQUA</b>	distilled water / destilliertes Wasser / acqua distillata / agua destilada / água destilada / eau distillée / destillerat vatten / destilleret vand / Destillert vann / απεσταγμένο νερό / дестилирана вода / destilovaná voda / дистиλλированная вода / destilovaná voda / Destilovaná Voda
<b>LOT</b>	lot / Charge / lotto / lote / lote / lot / sats / serie / Parti / ηαρία / партия номер / šarže / lot / šarže / Serija
<b>BUF</b>	Reaction buffer / Reaktionspuffer / tampone di reazione / tampón de reacció / Tampão de reação / tampon de réaction / Reaktionsbuffert / Reaktionsbuffer / Reaktionsbuffer / διάλυμα αντίδρασης / Реакционен буфер / Рабочий буферный раствор / Reakční pufr / Reakcioni pufer
<b>MTP</b>	microtiter plate / Mikrotiterplatte / placa microtiter / microplaca / microplaca / microplaques sensibilisées / Mikrotiterplatta / Mikrotiterplade / mikrotiterplate / πλάκα μικροπιλοδότησης / Микротитерная плака / Микропланшет / Mikrotitrační destička / Mikrotitracione ploče
<b>CAL</b>	Calibrator / Kalibrator / Calibratore / calibrador / calibrador / calibreur / Kalibrator / Kalibrator / Kalibrator / Βαθμονομητής / Калибратор / калибратор / kalibrátor / Kalibrator
<b>REF</b>	catalogue number / Katalognummer / numero di catalogo / número de catálogo / número de referência / réf. de catalogue / katalognummer / Katalognummer / αριθμός καταλόγων / καταложен номер / katalogové číslo / каталожный номер / katalogové číslo / Kataloški broj
<b>CONJ</b>	Conjugate / Konjugat / Coniugato / conjugado / conjugado / conjugaté / Konjugerad / Konjugat / Konjugat / συνδεδετικό / Конюгат / Конъюгат / Konjugát / Konjugat
<b>RTU</b>	ready to use / gebrauchsfertig / pronto all'uso / listo para usar / pronto a usar / prêt à l'emploi / færdig att användas / færdig til brug / klar til bruk/ έτοιμο προς χρήση / Готов за употреба / готов к использованию / k přímému použití / Razrediti ili rastvoriti
<b>CONT</b>	Control / Kontrolle / controllo / control / control / contrôle / Kontroll / Kontroll / Kontroll / διάλυμα ελέγχου / Контрол / Контрольный образец / Kontrola / Kontrola
<b>STOP</b>	stop solution / Stoppløsning / Soluzione di arresto / solución de parada / solução de paragem / solution d'arrêt / Stoppløsning / Stop-opløsning / Stoppløsning / διάλυμα παύσης / Стоп раствор / Стоп-раствор / Zastavovací roztok / Stop solucija
<b>DIL</b>	dilute or dissolve in / verdünnen oder lösen in / diluire o dissolvere in / diluir o dissolver / diluir ou dissolver em / diluer ou dissoudre dans / spädd eller upplöst i / fortyndes eller opløses i / Fortyndes eller opløses i / αρωση ή διάλυση σε / растворите или разрежете с / zředit anebo rozpuštit v / разбавить или растворить в / nafedte nebo rozpustit v / razrediti ili rastvoriti u
<b>SUB</b>	substrate / Substrat / substrato / substrato / substrato / substrat / Substrat / Substrat / Substrat / υπόστρωμα / Субстрат / Субстрат / Substrát / Substrat
<b>INC</b>	incubation buffer / Inkubationspuffer / tampone di incubazione / tampón de incubación / tampão de incubação / tampon d'incubation / Inkubationsbuffert/ Inkubationsbuffer/ Vaskebufferkonsentrat / διάλυμα επώασης / Инкубационен буфер / Буфер для инкубации / Inkubační pufr / Inkubacioni pufer
<b>WASH</b>	washing solution concentrate / Waschlösungskonzentrat / concentrado de solución de lavado / solução de lavado concentrada / tampão de lavagem concentrado / Tampon de lavage concentré / Vattenlösningkoncentrat / Vaskeopløsningskoncentrat / vaskeløsningskonsentrat / συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης / Концентриран миещ разтвор / Концентрат промывочного раствора / Koncentrát promývacího roztoku / Koncetrat solucije za ispiranje
<b>RUO</b>	For research use only



**PRODUCT DESCRIPTION**

**INTENDED USE**

TECHNOZYM® D-Dimer ELISA can be used to determine D-Dimer concentrations in plasma. D-Dimer is generated as a specific soluble degradation product during fibrinolysis. Elevated D-Dimer levels are found in cases of disseminated intravascular coagulation (DIC), deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE) but other circumstances may also lead to high D-Dimer levels such as old age, pregnancy, cancer, liver disease and infection. The ELISA system has a higher sensitivity when compared with latex agglutination tests thus giving an improved aid in the diagnosis for the exclusion of venous thromboembolism (VTE).

**COMPOSITION**

1. ELISA test strips (12), with 8 wells each, coated with anti D-Dimer monoclonal antibody; the drying agent is supplied in an aluminium bag.
2. Washing buffer concentrate (PBS; pH 7.3); containing detergent; 0.01 merthiolate; 1 bottle, 80 mL.
3. Incubation buffer (PBS; pH 7.3); contains stabiliser protein; 0.05% proclin; and blue dye, 1 bottle, 90 mL, ready for use.
4. Calibrators (Standards) numbered 1-5; lyophilised, 1 vial each. **Concentrations are lot-dependent; consult label on the vial.**
5. Control plasmas "low level" and "high level", lyophilised; 1 vial each. **Concentrations are lot-dependent; consult the label on the vial.**
6. Conjugate monoclonal Anti-D-Dimer-POX; dyed blue; 1 vial, 0.3 mL.
7. Chromogen TMB (tetramethylbenzidine); 1 bottle, 12 mL; ready for use.
8. Stopping solution: sulphuric acid 0.45 mol/L; 1 bottle 12 mL; ready for use.
9. Adhesive film for ELISA test strips (2).

**MATERIAL REQUIRED** (but not supplied with the kit)

1. Distilled water
2. Test tubes for diluting standard and samples
3. Measuring cylinder (1000 mL)
4. Precision pipettes (10, 100 and 1000 µL)
5. Variable pipette (1000 µL)
6. Multichannel and/or dispensing pipettes (100 and 200 µL)
7. ELISA washer or multichannel pipette
8. ELISA reader with 450 nm filter, with a 620 nm reference filter if available.

**WARNING AND PRECAUTIONS**

- All human blood or plasma products as well as samples must be considered as potentially infectious. They have to be handled with appropriate care and in strict observance of safety regulations. The rules pertaining to disposal are the same as applied to disposing hospital waste.
- Calibrators and control plasmas made from human blood and any individual plasma involved in the procedure is HBs Ag, HIV 1/2 Ab and HCV-Ab-negative (see labels on kit and/or bottles).
- Stopping solution (sulphuric acid) may irritate the skin. Should acid get into your eyes, wash out immediately with water and consult a doctor.
- The reagents sometimes contain preserving agents (merthiolate). Beware of swallowing! Avoid contact with skin or mucous membranes

**STABILITY AND STORAGE**

The expiry date printed on the labels applies to storage of the unopened bottles at + 2...8 °C. Stability after reconstitution/opening:

Material/Reagent	State	Storage	Stability
Calibrators, control plasmas	after reconstitution	-20 °C	6 months
ELISA test strip	after opening	2 ... 8 °C with adhesive film in plastic bag with drying agent	expiry date
Washing buffer conc.	after opening	2 ... 8 °C	6 months
Washing buffer	1+11,5 dilution of concentrate	2 ... 8 °C	3 weeks
Incubation buffer (= sample dilution buffer)	after opening	2 ... 8 °C	2 months
Conjugate	after opening	2 ... 8 °C	6 months
	working solution	room temperature	60 minutes
Chromogen TMB	after opening	2 ... 8 °C	expiry date

**TEST PROCEDURE**

**PREPARATION OF SAMPLES**

Sample material: Plasma.  
Citrate or EDTA plasma should be used. Centrifuge for 15 minutes at a minimum of 2500 g (DIN 58905). The plasma sample may be stored for 3 hours at room temperature; otherwise the sample ought to be frozen immediately after centrifugation. Stable at -20°C for 6 months. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Use of serum samples is not recommended.

**PREPARATION OF REAGENT**

1. Before starting the test, all the required components are to be brought to room temperature.
2. Preparing the washing buffer: Dilute 1 part by volume washing buffer concentrate with 11.5 parts by volume distilled water (1+11.5). Mix well! (Diluted washing buffer concentrate = washing buffer). There may be crystalline precipitations which will dissolve at 37°C within 10 minutes.
3. Reconstituting calibrators and control plasmas: Calibrators and control plasmas are reconstituted with 0.5 mL distilled water and mixed for 10 seconds after a reconstitution time of 15 minutes (vortex mixer). Reconstituted components are clear to slightly turbid. Control plasmas, normal and low level samples are used undiluted. For high level samples (up to 15-20 µg/mL) a dilution of 1:20 (20 µL plasma + 380 µL incubation buffer) is recommended, for abnormally high samples dilute 1:200 (40 µL plasma +360 µL incubation buffer).
4. Preparing the conjugate working solution (1+50): Dilute 1 part by volume conjugate with 50 parts by volume incubation buffer

**For 8 test wells: Mix 20 µL conjugate with 1000 µL incubation buffer**

**PERFORMANCE OF THE TEST**

<b>SAMPLE INCUBATION</b> (reference 1,2)	Pipette calibrators, control plasmas, diluted samples into test wells; cover test strips with film	100 µL
	Incubate at 37°C	60 minutes
<b>WASHING</b> (reference 1,3,4)	Washing buffer	3 x 200 µL
<b>CONJUGATE REACTION</b> (reference 1,2)	Pipette conjugate working solution into wells, cover test strip with film	100 µL
	Incubate at 37°C	60 minutes
<b>WASHING</b> (reference 1,3,4)	Washing buffer	3 x 200 µL
<b>SUBSTRATE REACTION</b> (reference 1,2)	Pipette Substrate solution into test wells, cover test strip with film	100 µL
	Incubate at room temperature	10 minutes
<b>STOPPING</b> (reference 1,2)	Pipette stopping solution into wells	100 µL
<b>MEASURING</b> (reference 5)	ELISA-Reader, 450 nm	shake 10 sec., measure within 10 min.

**References**

1. Reagents of different lots must not be combined
2. Precision and performance, among others, essentially depend on the following factors:
  - Thorough mixing of all substances used for dilution, 10 sec. with Vortex Mixer
  - Test calibrators, controls and samples in duplicates
  - Incubate at indicated temperature (RT: room temperature, 20...25°C)
  - Strict observance of the order of pipetting and of the time element as indicated
  - The time for sample incubation, conjugate and substrate reaction as indicated starts after pipetting the last sample. Incubation times should not vary by more than 5%.
  - During sample incubation and conjugate reaction, the time for pipetting calibrators/control plasmas/samples and/or conjugate solutions must not exceed 60 seconds per ELISA test strip (8 wells).
  - During substrate reaction and at stopping, the time needed for pipetting the substrate and/or the stopping solution must not exceed 10 seconds per ELISA test strip. Short pipetting times may be secured by using multichannel- and dispensing pipettes.
3. Label/number strips with a water resistant pen in case the strips accidentally fall out of the frame during testing.
4. After the last washing, wells must be aspirated thoroughly, turned upside down and positioned on a blotting paper; by gentle tapping, the last remnants must be removed.
5. By measuring the difference in wave lengths at 450 and 620 nm the precision of the test is increased.

**LIMITATION OF THE TEST**

The test cannot be used with serum samples. Interference with other Fibrin degradation products (FDP) can be mostly excluded as the antibody used is specific for a neo-antigen on the D-Dimer structure.

**ANALYSIS RESULTS**

**CALCULATION OF THE RESULTS**

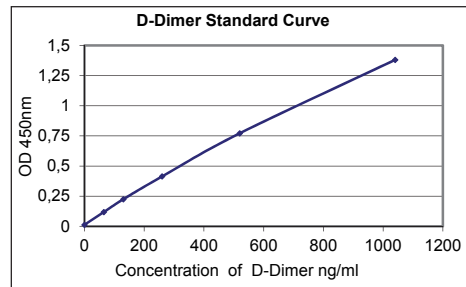
Setting up a reference curve: X axis: Concentration D-Dimer ng/mL  
Y axis: Extinction

Graph plot is linear-linear with a linear, point to point fit or cubic spline.

**Assessment of reference curve**

- The extinction coefficient of the highest calibrator should be between 1.0 and 2.5.
- The validity of the test may be checked on the basis of the calculated control values.

**Example of standard curve**



**Measuring concentration of samples**

- Read off the concentration from the reference curve.
- If there are samples with extinction coefficients higher than that of the highest point on the curve, they have to be prediluted with incubation buffer. The measured concentration then has to be multiplied with the dilution factor.

**REFERENCE RANGE**

Normal range for D-Dimer was determined between 0 – 250 ng/mL (n = 148). It is recommended that individual laboratories establish their own normal range.

**STANDARDISATION**

There is no international standard for D-Dimer. Technoclone's standard was calibrated against the standard of a commercial D-Dimer Latex assay.

**LITERATURE**

1. Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonization of D-Dimer assays; SSC Communication. Thromb Haemostas 1997; 77: 1031-3

## PRODUKTBESCHREIBUNG

### ANWENDUNG

Der TECHNOZYM® D-Dimer ELISA dient zur Bestimmung von D-Dimer Konzentrationen in Plasma. D-Dimer entsteht als spezifisches lösliches Abbauprodukt während der Fibrinolyse. Erhöhte D-Dimer Spiegel treten auf bei disseminierter intravasaler Gerinnung (DIG), tiefer Beinvenenthrombose (TVT) und Lungenembolien. Allerdings können auch Faktoren wie Alter, Schwangerschaft, Krebs, Leberschäden und Infektionen einen erhöhten D-Dimer Spiegel bewirken.

Der D-Dimer ELISA ist im Vergleich zu Latex-Agglutinationstests sensitiver und kann damit eine verbesserte Hilfestellung bei der Ausschluss Diagnose venöser Thromboembolien bieten.

### ZUSAMMENSETZUNG

- ELISA-Teststreifen (12); mit jeweils 8 Testvertiefungen; beschichtet mit anti D-Dimer monoklonalem Antikörper; mit Trockenmittel im Aluminiumbeutel verpackt.
- Waschpufferkonzentrat: (PBS; pH 7,3); detergentshaltig; 0,01% Merthiolat; 1 Fl.; 80 mL.
- Inkubationspuffer: (PBS; pH 7,3); blaugefärbt enthält Stabilisatorprotein; 0,05% Proclin; 1 Fl.; 90 mL; gebrauchsfertig
- Kalibratoren (Standards): nummeriert 1-5, lyophilisiert; jeweils eine Flasche. **Die chargenabhängigen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Flaschenetiketten!**
- Kontrollplasmen "high level" und "low level"; zur Richtigkeitskontrolle; lyophilisiert; jeweils eine Flasche. **Die chargenabhängigen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Flaschenetiketten!**
- Konjugat: monoklonaler Anti-D-Dimer-POX; blaugefärbt; 1 Flasche; 0,3 mL
- Chromogenes Substrat: TMB (Tetramethylbenzidin) 1 Flasche, 12 mL, gebrauchsfertig
- Stopplösung: Schwefelsäure 0,45 mol/l; 1 Flasche; 12 mL, gebrauchsfertig
- Ablebefolien: für ELISA-Teststreifen, 2 Stück

### BENÖTIGTES MATERIAL (nicht im Kit enthalten)

- Aqua dest
- Röhrchen zur Verdünnung der Standards und Proben
- Messzylinder (1000 mL)
- Präzisionspipetten (10, 100 und 1000 µL)
- Variable Pipette (1000 µL)
- Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten (100 und 200 µL)
- ELISA-Waschgerät oder Mehrkanalpipette
- ELISA-Reader mit 450 nm Filter (und 620nm Referenzfilter falls verfügbar)

### WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Alle humanen Blut- bzw. Plasmaprodukte und Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Sie sind mit der notwendigen Sorgfalt und entsprechend den Sicherheitsvorschriften zu behandeln und wie Krankenhausmüll zu entsorgen.
- Die Kalibratoren und Kontrollen, hergestellt aus humanem Blut, und jedes hierzu verwendete Einzelplasma ist Hb<sub>s</sub> Ag, HIV 1/2 Ak und HCV-Ak negativ (siehe Außen- bzw. Flaschenetikett).
- Stopplösung (Schwefelsäure) kann zu Reizungen der Haut führen. Sollte Säure in die Augen gelangen, sofort mit viel Wasser auswaschen und einen Arzt aufsuchen!
- Die Reagenzien enthalten teilweise Konservierungsmittel (Merthiolat). Nicht schlucken! Haut- oder Schleimhautkontakt vermeiden!

### LAGERUNG UND STABILITÄT

Die Reagenzien sind ungeöffnet bei +2...8°C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Datum verwendbar.

Stabilität nach Rekonstitution / nach Öffnen:

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Stabilität
Kalibratoren, Kontrollplasmen	nach Rekonstitution	-20 °C	6 Monate
ELISA-Teststreifen	nach Öffnen	2 ... 8 °C mit Ablebefolie in Alubeutel mit Trockenmittel	Verfallsdatum
Waschpufferkonzentrat	nach Öffnen	2 ... 8°C	6 Monate
Waschpuffer	1+11,5 Verdünnung des Konzentrats	2 ... 8 °C	3 Wochen
Inkubationspuffer (=Probenverdünnungspuffer)	nach Öffnen	2 ... 8 °C	2 Monate
Konjugat	nach Öffnen	2 ... 8 °C	6 Monate
	Gebrauchslösung	Raumtemperatur	60 Minuten
Chromogenes Substrat	nach Öffnen	2 ... 8 °C	Verfallsdatum

## TESTDURCHFÜHRUNG

### VORBEREITUNG DER PROBEN

Probenmaterial: Plasma

Es können Citrat-, oder EDTA- Plasmen verwendet werden. Zur Plasmagewinnung die Proben 15 min bei mindestens 2500g (DIN 58905) zentrifugieren. Plasmaproben können 3 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden; anderenfalls sollten die Proben sofort nach der Zentrifugation eingefroren werden (-20°C oder tiefer). Haltbarkeit bei -20°C: 6 Monate. Auftauen und wiedereinfrieren von Plasmaproben wird nicht empfohlen.

### VORBEREITUNG DES REAGENZES

- Vor Testbeginn alle benötigten Testkomponenten auf Raumtemperatur bringen.
- Herstellen des Waschpuffers: 1 Volumenteil Waschpufferkonzentrat mit 11,5 Volumenteilen Aqua dest. verdünnen (1+11,5). Gut mischen! (Verdünntes Waschpufferkonzentrat = Waschpuffer). Eventuelle kristalline Niederschläge gehen bei 37°C innerhalb von 10 min in Lösung.
- Rekonstituieren der Kalibratoren und Kontrollplasmen: Die Kalibratoren und Kontrollplasmen werden mit 0,5 mL Aqua dest. rekonstituiert und nach einer Rekonstitutionszeit von 15 Minuten 10 Sekunden gemischt (Probenmischer). Rekonstituierte Komponenten sind klar bis leicht trüb. Kontrollplasmen, normale und niedrige Proben werden unverdünnt eingesetzt. Für Proben mit hoher D-Dimer Konzentration (15-20 µg/mL) wird eine Vorverdünnung von 1:20 (20 µL Plasma + 380 µL Inkubationspuffer) empfohlen, für abnormal hohe Konzentrationen 1:200 (40 µL Plasma + 360 µL Inkubationspuffer).
- Herstellen der Konjugatgebrauchslösung (1+50): 1 Volumenteil Konjugat mit 50 Volumenteilen Inkubationspuffer verdünnen.

## TESTVERFAHREN

<b>PROBEN-INKUBATION</b> (Hinweise 1,2)	<b>Kalibratoren, Kontrollplasmen, verdünnte Proben</b> in Testvertiefung pipettieren. Teststreifen mit Folie abdecken Bei 37°C inkubieren	<b>100 µL</b> <b>60 Minuten</b>
<b>WASCHEN</b> (Hinweise 1,3,4)	<b>Waschpuffer</b>	<b>3 x 200 µL</b>
<b>KONJUGAT-REAKTION</b> (Hinweise 1,2)	<b>Konjugatgebrauchslösung</b> in Testvertiefung pipettieren. Teststreifen mit Folie abdecken Bei 37°C inkubieren	<b>100 µL</b> <b>60 Minuten</b>
<b>WASCHEN</b> (Hinweise 1,3,4)	<b>Waschpuffer</b>	<b>3 x 200 µL</b>
<b>SUBSTRAT-REAKTION</b> (Hinweis 1,2)	<b>Substratlösung</b> in Testvertiefungen pipettieren; Teststreifen mit frischer Folie abdecken Bei Raumtemperatur inkubieren	<b>100 µL</b> <b>10 Minuten</b>
<b>STOPPEN</b> (Hinweis 1,2)	<b>Stopplösung</b> in Testvertiefungen pipettieren	<b>100 µL</b>
<b>MESSEN</b> (Hinweis 5)	ELISA-Reader, 450nm	10 Sek. schütteln, Messung innerhalb von 10 Min.

### HINWEISE

- Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht kombiniert werden.
- Präzision und Wiederfindung hängen u.a. von folgenden Faktoren entscheidend ab:
  - Gute Durchmischung aller Verdünnungsansätze, 10 Sek. auf Probenmischer
  - Durchführung von Doppelbestimmungen
  - Inkubation bei der korrekten Temperatur (RT: Raumtemperatur; 20 - 25°C)
  - Genauere Einhaltung von Pipettierreihenfolge und Zeittakt.
  - Die angegebene Zeit für die Probeninkubation, Konjugat- und Substratreaktion wird nach der Pipettierung der letzten Probe genommen. Inkubationszeiten sollten um nicht mehr als ±5% variiert werden.
  - Bei der Probeninkubation und Konjugatreaktion darf die Zeit für die Pipettierung der verdünnten Kalibratoren/Kontrollplasmen/Proben bzw. Konjugatlösung 60 Sek. pro ELISA-Teststreifen (8 Vertiefungen) nicht überschreiten.
  - Bei der Substratreaktion und beim Stoppen darf die Pipettierzeit der Substrat- bzw. Stopplösung 10 Sek. pro ELISA-Teststreifen nicht überschreiten. Kurze Pipettierzeiten werden durch Verwendung von Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten erreicht.
- Teststreifen mit wasserfestem Stift markieren, falls sie während des Testes versehentlich aus der Halterung fallen sollten.
- Nach dem letzten Waschvorgang müssen die Testvertiefungen leer gesaugt und auf saugfähigem Papier ausgeklöpft werden.
- Durch Differenzwellenlängenmessung bei 450 nm und 620 nm wird die Präzision des Tests erhöht.

### EINSCHRÄNKUNG DER TESTDURCHFÜHRUNG

Der Test kann nicht mit Serum-Proben durchgeführt werden. Störungen durch andere Fibrin-Fragmente können weitgehend ausgeschlossen werden, da der verwendete Antikörper gegen ein Neo-Antigen auf der D-Dimer Struktur gerichtet ist.

## ANALYSENERGEBNISSE

### BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

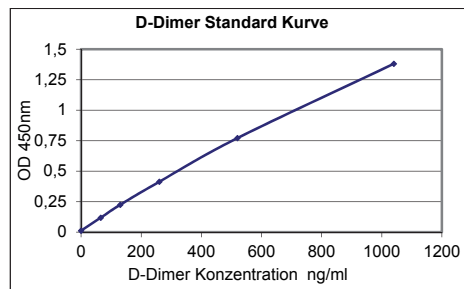
Erstellung der Bezugskurve: X-Achse: Konzentration D-Dimer ng/mL  
Y-Achse: Extinktion

Bezugskurve ist linear-linear, Werte Punkt zu Punkt oder mit linearer Regression verbinden oder cubic spline.

### Beurteilung der Bezugskurve

- Die Extinktion des höchsten Kalibrators sollte zwischen 1,0 und 2,5 liegen.
- Die Auswertbarkeit des Tests kann anhand der ermittelten Kontrollwerte überprüft werden

### Beispiel einer Standardkurve



### Konzentrationsbestimmungen der Proben

- Konzentrationen der Proben an der Bezugskurve ablesen.
- Sollte der Extinktionswert einer Probe höher als der des höchsten Standards liegen, so muss die Probe mit Inkubationspuffer vorverdünnt werden. Die ermittelte Konzentration wird in diesem Fall mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

### REFERENZBEREICHE

Der Normalbereich für D-Dimer liegt bei 0 - 250 ng/mL (n= 148). Es wird empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Normalbereich bestimmt.

### STANDARDISIERUNG

Es gibt keinen internationalen Standard für D-Dimer. Technoclone's Standard wurde gegen den Standard eines kommerziellen D-Dimer Latex Tests kalibriert.

### LITERATUR

- Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonization of D-dimer assays; SSC Communication. Thromb Haemostas 1997; 77: 1031-3

**Für 8 Testvertiefungen: 20 µL Konjugat mit 1000 µL Inkubationspuffer mischen.**

## DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

### INDICAZIONI D'USO

Il D-Dimero ELISA di TECHNOZYM® può essere usato per determinare le concentrazioni nel D-Dimero in plasma. Il D-Dimero è generato come prodotto solubile specifico di degradazione durante il fibrinolysis. I livelli elevati del D-Dimero sono trovati nei casi di coagulazione intravascolare diffusa (DIC), di trombosi profonda della vena (DVT) e dell'embolia polmonare (PE) ma altre circostanze possono anche condurre ai livelli elevati del D-Dimero quali la vecchia età, gravidanza, cancro, affezione epatica ed infezione. Il sistema di ELISA ha un'ipù alta sensibilità in paragone alle prove di agglutinazione del lattice che danno così un sussidio migliorato nella diagnosi per l'esclusione del thromboembolism venoso (VTE).

### COMPOSIZIONE

- Le strisce (12) del kit ELISA, ciascuna costituita da 8 pozzetti; ricoperti di anti anticorpo monoclonale de D-Dimero; l'agente essiccato è fornito in una busta di alluminio.
- Washing Buffer Concentrate (PBS; pH 7,3); contiene detergente; 0,01% di mertiolato; 1 vial di 80 ml.
- Incubation Buffer (PBS; pH 7,3); colorante azzurro, contiene proteina stabilizzante; 0,05% di proclin; 1 vial di 90 ml; pronto per l'uso.
- Calibratori (Standards): numerati; liofilizzati; una bottiglia di ciascuno. **Le concentrazioni sono lotto-specifiche; consultare l'etichetta sulla vial.**
- Plasmi di controllo "high level" e "low level": per il controllo di accuratezza; liofilizzati; una bottiglia di ciascuno. **Le concentrazioni sono lotto-specifiche; consultare l'etichetta sulla vial.**
- Coniugato: anti anticorpo monoclonale de D-Dimero-POX; colorato di blue; 1 vial di 0,3 ml.
- Substrato cromogeno TMB (tetrametilbenzidina); 1 vial di 12 ml, pronta per l'uso.
- Stopping Solution di acido solfidrico 0,45 mol/l; 1 vial di 12 ml, pronta per l'uso.
- Film adesivo: per le linee del saggio ELISA; 2 pezzi.

### MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI CON IL KIT

- Acqua bidistillata.
- Provette per diluire gli standard e i campioni.
- Cilindro graduato da 1000 ml.
- Pipette di precisione da 10, 100 e 1000 µl.
- Pipetta ripetitiva da 1000 µl.
- Pipette multicanale e/o dispensanti da 100 e 200 µl.
- Burette per ELISA o pipetta multicanale.
- Letto di piastra per ELISA con filtro a 450 nm e con filtro di riferimento a 620 nm se disponibile.

### ATTENZIONI E PRECAUZIONI

- Tutti i prodotti del sangue o del plasma così come tutti i campioni devono essere considerati come potenzialmente infettivi. Devono essere maneggiati con particolare attenzione e in stretta osservanza delle regole di sicurezza. Le regole riguardanti l'eliminazione sono le stesse applicate allo smaltimento riguardante gli ospedali.
- I calibratori e i plasmi controllo sono prodotti a partire da sangue umano e ogni plasma è stato testato e trovato negativo per gli anticorpi per l'HIV 1/2, HBs Ag e HVC (guardare l'etichetta sulle vials). Comunque tutti i prodotti derivati da sangue umano dovrebbero essere maneggiati con cura come se fossero materiale potenzialmente infettivo.
- La Stopping Solution (acido solforico) potrebbe essere irritante per la pelle. Se l'acido viene a contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente e consultare un dottore.
- Qualche volta i reagenti contengono composti conservanti (mertiolato). Stare attenti a non ingerire! Evitare il contatto con la pelle o le membrane mucose.

### STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza riportata sull'etichetta è relativa alla conservazione della vial non aperta a 2-8°C. La stabilità dopo ricostituzione/apertura:

Materiale/Reagente	Stato	Conservazione	Stabilità
Calibratori, plasmi controllo	Dopo ricostituzione	-20 °C	6 mesi
Strisce del kit ELISA	Dopo apertura	2-8°C con il film adesivo nel sacchetto di plastica con un essiccante	Data di scadenza
Washing Buffer Concentrate	Dopo apertura	2 ... 8°C	6 mesi
Washing Buffer	1+11,5 diluizioni del concentrato	2 ... 8 °C	3 settimane
Incubation Buffer	Dopo apertura	2 ... 8 °C	2 mesi
IgG coniugato	Dopo apertura	2 ... 8 °C	6 mesi
	Soluzione di lavoro	Temperatura ambiente	60 minuti
Cromogeno TMB	Dopo apertura	2 ... 8 °C	Data di scadenza

## TESTDURCHFÜHRUNG PROCEDURE DEL TEST

### PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Materiale: plasma  
Il plasma citratato o EDTA dovrebbe essere usato. Centrifughi per 15 minuti ad un minimo di 2500 il g (DIN 58905).  
Il campione di plasma può essere conservato per tre ore a temperatura ambiente, oppure congelato immediatamente dopo la centrifugazione. (-20°C o più profondo). Conservazione a -20°C. Durata: 6 mesi. I campioni non possono essere congelati e non hanno sciolto parecchie volte.

### PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Prima di iniziare il saggio, tutti i componenti necessari devono essere portati a temperatura ambiente.
- Preparazione del Washing Buffer: diluire 1 parte in volume del Washing Buffer Concentrate con 11,5 parti in volume di acqua bidistillata (1+11,5). Miscelare bene! (Il Washing Buffer diluito è il tampono utilizzato nei lavaggi). Si potrebbero formare dei precipitati cristallini che si scioglieranno a 37°C in 10 minuti.
- Ricostituzione dei calibratori e dei plasmi controllo: i calibratori e i plasmi controllo sono ricostituiti con **0,5 mL** di acqua bidistillata e miscelati per 10 secondi dopo un tempo di ricostituzione di 15 minuti (usare un Vortex Mixer). I reagenti ricostituiti vanno da un aspetto limpido a leggermente torbido.  
Controlli i plasmi, normale ed i campioni del basso livello sono usati non diluiti. Per i campioni che del livello elevato (fino a 15-20 µg/mL) una diluizione di 1:20 (un plasma dei 20 µL + amplificatore di incubazione dei 380 µL) è suggerita, dato che i campioni anormalmente alti diluono 1:200 (40 amplificatore di incubazione del µL del plasma +360 del µL).
- Preparazione della soluzione di lavoro del coniugato (1+50): diluire 1 parte in volume del coniugato con 50 parti in volume del Buffer di incubazione.

Per 8 pozzetti del test : mischiare 20 µL di coniugato con 1000 µL di buffer di incubazione.

### PERFORMANCE DEL SAGGIO

INCUBAZIONE DEL CAMPIONE (reference 1,2)	Calibratori delle pipette, plasmi controllo, campioni diluiti nei pozzetti del saggio; coprire le linee del test con un film	100 µL
	Incubare a 37°C	60 minuti
LAVAGGI (reference 1,3,4)	Washing Buffer	3 x 200 µL
REAZIONE DI CONIUGAZIONE (reference 1,2)	Aggiungere la <b>Conjugate working solution</b> nei pozzetti, coprendo le strisce del test con un film	100 µL
	Incubare a 37°C	60 minuti
LAVAGGI (reference 1,3,4)	Washing Buffer	3 x 200 µL
REAZIONE CON IL SUBSTRATO (reference 1,2)	Aggiungere la <b>Substrate solution</b> nei pozzetti, coprendo le strisce del test con un film	100 µL
	Incubare a temperatura ambiente	10 minuti
STOPPING (reference 1,2)	Inserire la <b>Stopping solution</b> nei pozzetti	100 µL
MISURAZIONE (reference 5)	Letto di piastre ELISA, 450 nm	Agitare 10 secondi; misurare entro 10 minuti

### Reference

- I reagenti di differenti lotti non devono essere mischiati.
- La precisione e la performance, dipendono, tra le altre cose, dai seguenti fattori:
  - miscelare tutte le componenti usate per la diluizione 10 secondi con il Vortex Mixer.
  - utilizzare i calibratori, i controlli e i campioni in duplicato.
  - incubare alla temperatura indicata (RT: temperatura ambiente, 20...25°C).
  - stretto rispetto dell'ordine di aggiunti dei composti nei pozzetti e dei tempi come indicato.
  - il tempo di incubazione del campione, di reazione del coniugato e del substrato come indicato inizia dopo aver aggiunto l'ultimo campione. Il tempo di incubazione non dovrebbe variare di più o meno un 5%.
  - durante il tempo di incubazione e di reazione del coniugato, il tempo impiegato per aggiungere i calibratori/controlli plasma/campioni e/o soluzioni dei coniugati non deve superare i 60 secondi per ogni striscia del kit dell'ELISA (8 pozzetti).
  - durante la reazione con il substrato e allo stopping, il tempo necessario per l'aggiunta del substrato e/o della Stopping Solution non deve superare i 10 secondi per ogni striscia del kit dell'ELISA. Un ridotto tempo di pipettamento potrebbe essere ottenuto utilizzando pipette ripetitive o pipette multicanale.
- Ogni striscia del kit ELISA deve essere numerata con pennarello indelebile per evitare ogni errore in caso di errato posizionamento nel telaio durante le varie operazioni
- Dopo l'ultimo lavaggio i pozzetti devono essere completamente aspirati, capovolti e posti su carta da blotting, rimuovendo le gocce rimanenti colpendo delicatamente gli stessi
- La precisione del test è aumentata se si calcola la differenza tra la lettura a lunghezza d'onda 450 nm e quella a 620 nm.

### LIMITAZIONI DEL SAGGIO

La prova non può essere usata con i campioni del siero. L'interferenza con altri prodotti di degradazione del fibrin (FDP) può principalmente essere esclusa come l'anticorpo usato è specifica per un neo-antigene sulla struttura del D-Dimero.

### ANALISI DEI RISULTATI

#### CALCOLO DEI RISULTATI

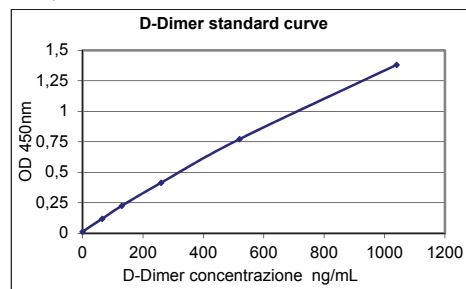
Costruzione di una curva standard: asse delle X: concentrazione D-Dimer ng/mL  
asse delle Y: estinzione

Il grafico è lineare se calcolato con una regressione lineare o punto per punto o cubic spline.

Calcolo della curva standard:

- Il coefficiente di estinzione del calibratore più alto dovrebbe essere compreso tra 1,0 e 2,5.
- La validità del saggio dovrebbe essere controllata sulla base dei valori ottenuti con i controlli.

Esempio di curva standard



#### Misurazione delle concentrazioni dei campioni

- Calcolare le concentrazioni dalla curva standard.
- Se ci sono campioni con coefficiente d'estinzione più alto di quello del punto più alto della curva, questi devono essere prediluiti con il Buffer di incubazione. La misura delle concentrazioni poi deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione rispettivamente.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI/INTERVALLO DI RIFERENZA

Il valore normale del D-Dimer è compreso fra 0 – 250 U/mL (n=148). Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri intervalli di riferimento.

### STANDARDIZZAZIONE

Non ci è campione internazionale per il D-Dimero. Il campione del Technoclone è stato calibrato contro il livello di D-Dimer Latex commerciale (Analisi del lattice).

### LETTERATURA

- Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonization of D-dimer assays; SSC Communication. Thromb Haemostas 1997; 77: 1031-3

**DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO**

**APLICACIÓN**

TECHNOZYM® D-Dimer ELISA se puede utilizar para determinar la concentración de Dímero D en plasma. El Dímero D se genera como un producto de degradación soluble durante la fibrinólisis. Se encuentran niveles elevados de Dímero D en coagulación intravascular diseminada (DIC) trombosis venosa (DVT) y embolismo pulmonar (PE) otras circunstancias pueden hacer elevar la concentración de Dímero D como edad avanzada, embarazo, cáncer, enfermedad hepática e infecciones.

La técnica de ELISA tiene una elevada sensibilidad comparada con la técnica de aglutinación en látex, es una ayuda importante en el diagnóstico y permite excluir el tromboembolismo venosos (VTE).

**COMPOSICIÓN**

- Las tiras de pruebas ELISA (12) con 8 pocillos cada una, recubiertas con anticuerpo monoclonal anti Dímero D, el agente desecante va en una bolsa de aluminio.
- El concentrado de tampón de lavado: (PBS; pH 7,3); contiene detergente; 0,01% mertiolato; 1 frasco, 80 ml.
- Tampón de incubación: (PBS; pH 7,3); contiene proteína estabilizadora; 0,05% proclin; y 1 frasco de colorante azul, 90 mL; listo para usarse.
- Calibradores (estándares) numerados; liofilizados; 1 frasco de cada uno.  
**Las concentraciones dependen del lote; consultar la etiqueta en el vial.**
- Plasmas de control "nivel bajo" y "nivel alto" con fines de comprobación, liofilizados; 1 frasco de cada uno.  
**Las concentraciones dependen del lote; consultar la etiqueta en el vial.**
- Cromógeno TMB (tetrametilbenzidina); 1 frasco, 12 mL; listo para usarse.
- Solución parada: ácido sulfúrico 0,45 mol/l; 1 frasco, 12 mL; listo para usarse.
- Película adhesiva para las tiras de pruebas ELISA (2).

**MATERIAL NECESARIO** (no se suministra con el kit)

- Agua destilada
- Tubos de ensayo para diluir estándares y muestras
- Probeta graduada (1000 mL)
- Pipetas de precisión (10, 100 und 1000 µl)
- Pipeta variable (1000µl)
- Pipetas multicanal y/o dispensadoras (100 und 200 µl)
- Lavador ELISA o pipeta multicanal
- Lector ELISA con filtro de 450 nm (filtro de referencia de 620 nm si resulta disponible.)

**ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES**

- Todos los productos sanguíneos o plasmáticos, así como las muestras se deben considerar potencialmente infecciosos. Se deben tratar con las debidas precauciones de conformidad con los reglamentos de seguridad biológica vigentes. Los desechos se deberán eliminar como en los hospitales. Los calibradores y plasmas de control son fabricados con sangre humana y cada plasma empleado en el procedimiento es HBsAg, HIV 1/2 Ac y HCV-Ac-negativo (véanse las etiquetas en el kit y/o en los frascos).

- La solución de parada (ácido sulfúrico) puede irritar la piel. En caso de que el ácido alcance sus ojos, láveselos inmediatamente y acuda a un médico

- Los reactivos contienen en ocasiones agentes conservantes (mertiolato). ¡ NO DEBE SER INGERIDO! Evítese el contacto con la piel o membranas mucosas

**ESTABILIDAD Y CONSERVACION**

Los reactivos se deben guardar a una temperatura de entre + 2...8 °C y utilizarse antes de la fecha indicada en las etiquetas.

Estabilidad después de la reconstrucción / apertura:

Material/Reactivo	Situación	Conservación	Estabilidad
Calibradores, plasma de control	después de la reconstrucción	-20 °C	6 meses
Tiras de pruebas	después de su apertura	2...8 °C con película adhesiva en una bolsa de plástico con deshidratante	fecha de caducidad
Concentrado de tampón de lavado	después de su apertura	2...8°C	6 meses
Tampón de lavado	1+11,5 dilución de concentrado	2...8°C	3 semanas
Tampón de incubación	después de su apertura	2...8°C	2 meses
Conjugado	después de su apertura	2...8°C	6 meses
	solución de empleo	temperatura ambiente	60 minutos
Cromógeno TMB	después de su apertura	2...8°C	fecha de caducidad

**MÉTODO DE LA PRUEBA**

**PREPERACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Material: plasma

Se puede utilizar muestras de plasma con Citrato o EDTA plasmas. Centrifugar durante 15 minutos a 2500g (DIN 58905) o velocidad superior. Las muestras de plasma se pueden almacenar durante 3 horas a Temperatura ambiente; las muestras también se pueden congelar a -20°C o temperaturas inferiores después de la centrifugación. No son recomendables las congelaciones y descongelaciones repetidas.

**PREPARACIÓN DEL REACTIVO**

- Antes de iniciar la prueba, deberán ponerse a temperatura ambiente todos los componentes necesarios.
- Preparar el tampón de lavado: Diluir una parte de volumen de concentrado de tampón de lavado con 11,5 partes de volumen de agua destilada (1+11,5). ¡Mézclase bien! (concentrado de tampón de lavado diluido = tampón de lavado). Pueden producirse precipitaciones cristalinas que se disolverán a 37°C en 10 minutos.
- Calibradores de reconstrucción y plasmas de control: Los calibradores y los plasmas de control se reconstituyen con 0,5 mL de agua destilada y se mezclan durante 10 segundos después de un tiempo de reconstrucción de 15 minutos (mezclador Vortex). Los componentes reconstituidos resultan claros o ligeramente turbios. Plasmas control normal y bajo, se usaran sin diluir. Para muestras con niveles altos (más de 15-20 µg/mL) se recomienda una dilución 1:20 (20 µL plasma + 380 µL tampón incubación), para muestras anormalmente elevadas se recomienda diluir 1:200 (40 µL plasma +360 µL tampón incubación).
- Preparar la solución de empleo de conjugado (1+50): Diluir 1 parte de volumen de conjugado con 50 partes de volumen de tampón de incubación:

**Para 8 pocillos: Mezclar 20 µL de conjugado con 1000 µL de tampón de incubación.**

**MÉTODO DE LA PRUEBA**

<b>INCUBACIÓN DE LA MUESTRA</b> (referencia 1, 2)	calibradores diluidos pipetear los plasmas de control y muestras en pocillos de pruebas. Cubrir las tiras de pruebas con una película de plástico.	100 µL
	incubar a 37°C	60 minutos
<b>LAVADO</b> (referencia 1,3,4)	tampón de lavado	3 x 200 µL
<b>REACCIÓN DE CONJUGADO</b> (referencia 1,2)	pipetear la solución de uso del conjugado en los pocillos, cubrir las tiras de pruebas con una película de plástico.	100 µL
	incubar a 37°C	60 minutos
<b>LAVADO</b> (referencia 1,3,4)	tampón de lavado	3 x 200 µL
<b>REACCIÓN DE SUBSTRATO</b> (referencia 1,2)	pipetear la solución de sustrato en los pocillos. Cubrir las tiras de pruebas con una película de plástico.	100 µL
	Incubar a temperatura ambiente	10 minutos
<b>SOLUCIÓN PARADA</b> (referencia 1,2)	pipetear la solución de parada en los pocillos	100 µL
<b>MEDICIÓN</b> (referencia 5)	Lector ELISA, 450 nm	Agitar durante 10 seg. Medir en 10 min.

**Advertencias**

- No se deben combinar los reactivos de diferentes lotes
- La precisión y reproducibilidad dependen principalmente, entre otras cosas, de los siguientes factores:
  - La mezcla a fondo todas las sustancias empleadas en la dilución
  - Deben probarse los calibradores de pruebas, controles y muestras en duplicado
  - La incubación debe llevarse a cabo a temperaturas adecuadas
  - El estricto seguimiento del orden en que se llevan las pruebas con la pipeta y en el tiempo indicado
  - El tiempo indicado para la incubación de la muestra, la reacción de conjugado y de sustrato se inicia tras efectuar la prueba de la última muestra con la pipeta. Los tiempos de incubación no deberán variar en más de ±10%.
  - Durante la incubación de la muestra y la reacción de conjugado, el tiempo para pipetear los calibradores/muestras/plasmas de control y/o soluciones de conjugado diluidos, no debe exceder de 60 segundos para la tira de prueba ELISA (8 pocillos).
  - Durante la reacción de sustrato y el stop, el tiempo necesario para pipetear el sustrato y/o la solución parada no debe exceder de 10 segundos por cada tira de prueba ELISA. Se podrán lograr tiempos breves en las pruebas usando pipetas multicanal y dispensadoras.
- Indicar el número en las tiras con un lapiz resistente al agua para el caso en que se desprendan accidentalmente de su sitio durante la realización de la prueba.
- Después del último lavado, los pocillos deben ser aspirados a fondo, darlos la vuelta y colocarlos sobre un papel absorbente; los últimos residuos se deben eliminar golpeando suavemente.
- Mediante la medición de la diferencia en longitudes de onda a 450 y 620 nm o a 450 y 690 nm, se incrementa la precisión de la prueba.

**LIMITACIONES DE LA PRUEBA**

Este test no puede ser usado con muestras de suero. Las interreferencias con otros productos de degradación de la fibrina (FDP) se pueden excluir ya que el anticuerpo usado es específico del neo-antígeno de la estructura del dímero D.

**RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS  
CÁLCULO DE LOS RESULTADOS**

Trazado de una curva de referencia: Eje X: Concentración D-Dimer ng/mL  
Eje Y: Extinción

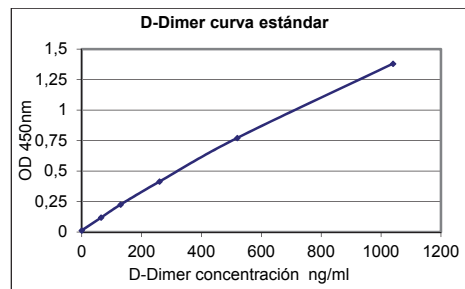
La curva de referencia es lineal-lineal; únanse los valores.

Evaluación de la curva de referencia:

La extinción del coeficiente del calibrador más alto deberá estar de entre 1,0 y 2,5.

La validez de la prueba se puede comprobar sobre la base de los valores de control calculados.

Ejemplo de curva estándar:



Medición de las muestras de concentración:

- Léase la concentración en la curva de referencia.
- En caso de haber muestras con mayores coeficientes de extinción que el punto estándar más elevado en la curva, tendrán que ser diluidos previamente con tampón de incubación. La concentración medida tiene que multiplicarse por el factor de dilución.

**RANGO DE REFERENCIA**

Rango normal con respecto al D-Dimer se encuentra entre 0 – 250 ng/mL (n=148). Se recomienda que los distintos laboratorios establezcan su propio rango normal.

**ESTANDARDIZACIÓN**

No existe un standard internacional para el Dímero D. El standard de Technoclone se ha calibrado con el standard del ensayo de látex comercial.

**LITERATURA**

- Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonization of D-dimer assays; SSC Communication. Thromb Haemostas 1997; 77: 1031-3

## DESCRIÇÃO DO PRODUTO

### USO

O "TECHNOZYM® D-Dimer ELISA" pode ser utilizado para determinar concentrações de D-Dímero no plasma. O D-Dímero é gerado como um produto da degradação específico e solúvel durante a fibrinólise. São encontrados níveis elevados de D-Dímeros em casos de coagulação intravascular disseminada (CID), trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP), mas outras circunstâncias também podem levar a níveis elevados de D-Dímero tais como idade avançada, gravidez, cancro, doença hepática e infecção.

O sistema por ELISA tem uma sensibilidade mais elevada quando comparado com testes de aglutinação de látex, dando assim uma melhor ajuda no diagnóstico para exclusão de tromboembolismo venoso (TEV).

### COMPOSIÇÃO

1. Tiras para teste ELISA (12): com 8 poços cada; revestidas com anticorpo monoclonal anti D-Dímero; embaladas em saco de alumínio com agente secante.
2. Tampão de lavagem concentrado: (PBS; pH 7,3); contém detergente; 0,01% de mertiolato; 1 frasco, 80 mL.
3. Tampão de incubação: (PBS; pH 7,3); contém proteína estabilizante; 0,05% de proclín; e corante azul; 1 frasco, 90 mL, pronto a usar.
4. Calibradores (Padrões): Numerados de 1 a 5; liofilizados, um frasco de cada. **As concentrações são dependentes do lote; consultar o rótulo do frasco.**
5. Plasmas de controlo "nível baixo" e "nível alto", liofilizados; um frasco de cada. **As concentrações são dependentes do lote; consultar o rótulo do frasco.**
6. Conjugado Anti-D-Dimer-POX monoclonal; coloração azul; 1 frasco, 0,3 mL.
7. Cromogéneo TMB (tetrametilbenzidina); 1 frasco, 12 mL; pronto a usar.
8. Solução de paragem: ácido sulfúrico 0,45 mol/l; 1 frasco, 12 mL; pronto a usar.
9. Película adesiva para tiras de teste ELISA (2).

### MATERIAL NECESSÁRIO (mas não fornecido com o kit)

1. Água destilada
2. Tubos de ensaio para diluir os padrões e as amostras
3. Proveta aferida (1000 mL)
4. Pipetas de precisão (10, 100 e 1000 µL)
5. Pipeta de volume variável (1000 µL)
6. Pipetas multicanal e/ou de dispensação (100 e 200 µL)
7. Lavadora ELISA ou pipeta multicanal
8. Leitor ELISA com filtro de 450 nm, com um filtro de referência de 620 nm, se disponível

### ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Todos os produtos de sangue ou plasma humano bem como as amostras devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Devem ser manuseados com os cuidados necessários e em cumprimento rigoroso das regras de segurança. Devem ser eliminados de acordo com as normas para eliminação de lixo hospitalar.
- Os calibradores e os plasmas de controlo produzidos a partir de sangue humano e qualquer plasma individual envolvido no procedimento são negativos para Ag Hbs, Ac HIV 1/2 e Ac HCV (ver rótulo no kit e/ou no frasco).
- A solução de paragem (ácido sulfúrico) pode irritar a pele. Caso o ácido entre nos olhos, lavar imediatamente com bastante água e consultar um médico.
- Alguns reagentes contêm conservantes (mertiolato). Não ingerir! Evitar contacto com a pele ou membranas mucosas!

### CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

A data de validade impressa no rótulo do reagente aplica-se ao armazenamento dos frascos fechados entre +2 a 8°C.

Estabilidade após a reconstituição / abertura:

Material/reagente	Estado	Armazenamento	Estabilidade
Calibradores, plasmas de controlo	após reconstituição	-20 °C	6 meses
Tiras de teste ELISA	depois de aberto	2 ... 8 °C com película adesiva no saco de plástico com agente secante	Data de vencimento
Tampão de lavagem concentrado	depois de aberto	2 ... 8 °C	6 meses
Tampão de lavagem	1+11,5 diluição do concentrado	2 ... 8 °C	3 semanas
Tampão de incubação (= tampão de diluição da amostra)	depois de aberto	2 ... 8 °C	2 meses
Conjugado	depois de aberto	2 ... 8 °C	6 meses
	solução de trabalho	Temperatura ambiente	60 minutos
Cromogéneo TMB	depois de aberto	2 ... 8 °C	Data de validade

## PROCEDIMENTO DO TESTE

### PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Material das amostras: Plasma.  
Deve ser utilizado plasma citratado o EDTA. Centrifugar durante 15 min a pelo menos 2500 g (DIN 58905). A amostra de plasma pode ser conservada durante 3 horas à temperatura ambiente; caso contrário a amostra deve ser congelada imediatamente após a centrifugação. Estável a -20°C durante 6 meses. Evitar a repetição de ciclos congelar-descongelar. Não se recomenda a utilização de amostras de soro.

### PREPARAÇÃO DO REAGENTE

1. Antes de iniciar o teste, deixar todos os componentes necessários atingir a temperatura ambiente.
2. Preparação do tampão de lavagem: Diluir 1 parte de concentrado de tampão de lavagem com 11,5 partes de água destilada (1+11,5, v/v). Misturar bem! (diluição do tampão de lavagem concentrado = tampão de lavagem). Podem ocorrer precipitações cristalinas as quais dissolvem a 37°C ao fim de 10 min.
3. Reconstituição dos calibradores e plasmas de controlo: Os calibradores e plasmas de controlo são reconstituídos com 0,5 mL de água destilada e, depois de um tempo de reconstituição de 15 minutos, misturados durante 10 segundos (agitador vortex). O aspecto dos componentes reconstituídos varia de transparente a ligeiramente turvo. Os plasmas de controlo e as amostras de nível normal e baixo são utilizados sem diluição. Para amostras de nível elevado (até 15-20 µg/mL) é recomendada uma diluição de 1:20 (20 µL de plasma + 380 µL de tampão de incubação), para amostras anormalmente elevadas diluir a 1:200 (40 µL plasma + 360 µL tampão incubação).
4. Preparação da solução de trabalho do conjugado (1+50): Diluir 1 parte de conjugado com 50 partes de tampão de incubação (v/v).

**Para 8 poços de teste: Misturar 20 µL de conjugado com 1000 µL de tampão de incubação.**

## REALIZAÇÃO DO TESTE

<b>INCUBAÇÃO DAS AMOSTRAS</b> (referência 1, 2)	Pipetar os calibradores, plasmas de controlo e amostras diluídas nos poços de teste; cobrir as tiras de teste com película Incubar à 37°C	100 µL 60 minutos
<b>LAVAGEM</b> (referência 1, 3, 4)	<b>Tampão de lavagem</b>	3x200 µL
<b>REACÇÃO DO CONJUGADO</b> (referência 1, 2)	Pipetar a <b>solução de trabalho do conjugado</b> nos poços. Cobrir as tiras de teste com película Incubar à 37°C	100 µL 60 minutos
<b>LAVAGEM</b> (referência 1, 3, 4)	<b>Tampão de lavagem</b>	3x200 µL
<b>REACÇÃO DO SUBSTRATO</b> (referência 1, 2)	Pipetar a <b>solução de substrato</b> nos poços de teste. Cobrir as tiras de teste com película Incubar à <b>Temperatura ambiente</b>	100 µL 10 minutos
<b>PARAGEM</b> (referência 1, 2)	Pipetar a <b>solução de paragem</b> nos poços	100 µL
<b>MEDIÇÃO</b> (referência 5)	Leitor para ELISA, 450nm	Agitar 10 seg., medir dentro de 10 minutos

### Referências

1. Reagentes de lotes diferentes não podem ser combinados.
2. A precisão e o desempenho dependem essencialmente, entre outros, dos seguintes factores:
  - Boa mistura de todas as substâncias usadas para diluição, 10 segundos no agitador vortex
  - Testar calibradores, controlos e amostras em duplicado
  - Incubar à temperatura indicada (TA: temperatura ambiente, 20...25°C)
  - Cumprimento rigoroso da sequência de pipetagem e do elemento tempo como indicado:
  - O tempo indicado para a incubação da amostra, reacção do conjugado e do substrato começa depois de pipetar a última amostra. Os tempos de incubação não devem variar mais que ± 5%.
  - Durante a incubação da amostra e reacção do conjugado, o tempo para pipetar os calibradores/plasmas de controlo/amostras e/ou soluções de conjugado não podem exceder 60 segundos para cada tira de teste ELISA (8 poços).
  - Durante a reacção do substrato e na paragem, o tempo necessário para pipetar o substrato e/ou a solução de paragem não deve exceder 10 segundos para cada tira de teste ELISA. Tempos de pipetagem curtos são assegurados utilizando pipetas multicanal ou pipetas de dispensação.
3. Marcar/numerar as tiras de teste com uma caneta resistente à água, caso as tiras se soltem acidentalmente de sua fixação durante o teste.
4. Após a última lavagem, os poços devem ser aspirados completamente, invertidos e batidos sobre papel absorvente para remover os últimos resíduos.
5. Medindo a diferença de comprimentos de ondas a 450 nm e 620 nm, a precisão do teste será aumentada.

### LIMITAÇÃO DO TESTE

O teste não pode ser utilizado com amostras de soro. A interferência com outros produtos de degradação da fibrina (PDF) pode ser praticamente excluída pois o anticorpo utilizado é específico para um neo-antígeno na estrutura do D-Dímero.

## RESULTADOS DAS ANÁLISES

### CÁLCULO DOS RESULTADOS

Elaboração da curva de referência: Eixo X: Concentração de D-Dímero ng/mL  
Eixo Y: Extinção

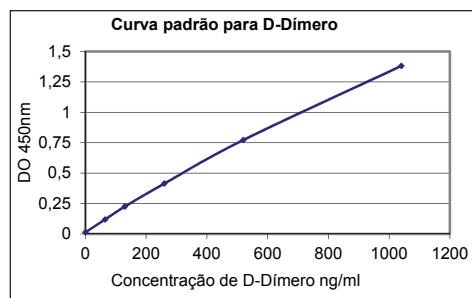
O tipo de gráfico é linear-linear, com um traçado linear, ponto a ponto ou curva cúbica ("cubic spline")

### Avaliação da curva de referência

O coeficiente de extinção do calibrador mais alto deve situar-se entre 1,0 e 2,5.

A validade do teste pode ser verificada com base nos valores de controlo calculados.

### Exemplo de uma curva-padrão:



### Determinação das concentrações das amostras

- Fazer a leitura das concentrações das amostras na curva de referência.
- Se o coeficiente de extinção de uma amostra for superior ao ponto mais alto da curva, então a amostra deve ser previamente diluída com tampão de incubação. Neste caso, a concentração determinada tem de ser multiplicada pelo factor de diluição.

### INTERVALO DE REFERÊNCIA

O intervalo normal para D-Dímero foi determinado entre 0 – 250 ng/mL (n=148).

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo normal.

### PADRONIZAÇÃO

Não existe um padrão internacional para D-Dímero. O padrão da Technoclone foi calibrado contra o padrão do ensaio D-Dimer Látex comercial.

### LITERATURA

1. Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonization of D-dimer assays; SSC Communication. Thromb Haemostas 1997; 77: 1031-3

## DESCRIPTION DU PRODUIT

### UTILISATION PRÉVUE

Le Technozym® D-Dimer ELISA peut être utilisé pour déterminer la concentration des D-dimères dans le plasma. Les D-dimères sont des produits solubles de la fibrinolyse. Des taux élevés de D-dimères sont trouvés dans des cas de coagulation intravasculaire disséminée, thrombose veineuse aiguë, et embolie pulmonaire. D'autres circonstances peuvent cependant amener à des niveaux élevés de D-dimères comme l'âge, la grossesse, le cancer, les atteintes du foie, et certains cas d'infection. Le système ELISA a une sensibilité plus grande quand comparée avec les tests turbidimétriques d'aggrégation des billes de latex, ce qui permet d'affiner ainsi le diagnostic en excluant le thromboembolisme veineux.

### CONTENU

- 12 bandelettes de test ELISA contenant 8 puits chacune, coâtées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les D-dimères; et un agent détissant; emballés dans un sac d'aluminium.
- Tampon de lavage concentré: (PBS; pH 7,3); contenant du détergent; 0,01% de merthiolate; 1 bouteille 80 mL.
- Tampon d'incubation: (PBS; pH 7,3); contient la protéine de stabilisateur; 0,05% proclin; et colorant bleu, 1 bouteille 90 mL prêt à l'emploi.
- Calibrateur numérotés; lyophilisés; chacun dans une fiole.  
**Les concentrations sont dépendantes du lot; consulter les étiquettes sur les fioles.**
- 2 Contrôles plasmatiques "high level" et "low level"; lyophilisés; une bouteille de chaque. **Les concentrations sont dépendantes du lot; consulter les étiquettes sur les fioles.**
- Conjugué: Anticorps monoclonal anti D-dimère marqué à la peroxydase de Raifort de couleur bleu, une fiole, 0,3 mL. 7. Chromogène TMB (tétraméthylbenzidine); 1 bouteille, 12 mL; prêt à l'emploi.
- Substrat chromogénique: TMB (tétraméthylbenzidine) 1 fiole; 12 mL; prêt à l'emploi
- Solution d'arrêt: acide sulfurique 0,45 mol/L; 1 bouteille 12 mL; prête à l'emploi.
- 2 films adhésifs for les bandes de tests ELISA.

### MATÉRIEL REQUIS (non fourni avec le kit)

- Eau distillée
- Tubes de dilution pour les calibrateurs et les échantillons
- Eprouvette graduée de 1000 mL
- Pipettes de précision (10, 100, 1000 µL)
- Pipette variable (1000 µL)
- Pipettes multi canal (100, 200 µL)
- Automate de lavage ELISA ou pipette multi canal.
- Lecteur de plaque ELISA équipée d'un filtre à 450 nm et si possible d'un filtre de référence à 620 nm.

### AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Tous les produits élaborés à partir de sang humain et de plasma doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux. Ils doivent être manipulés avec une attention particulière, et ceci dans la stricte observance des règles de sécurité. Les règles concernant le stockage des déchets sont identiques à celles appliqués à l'hôpital.
- Les standards et contrôles plasmatiques sont élaborés à partir de sang humain, et tout plasma utilisé lors du test est HBS Ag, HIV 1/2 et HCV-Ag-négatif (voir les étiquettes sur le kit et/ou sur les bouteilles).
- une solution d'arrêt (acide sulphurique) peut être irritante pour la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement avec de l'eau distillée et consulter un docteur.
- Les réactifs contiennent des agents préservant (merthiolate). Ne pas avaler! Eviter tout contact avec la peau ou les muqueuses.

### STABILITÉ ET STOCKAGE

Les réactifs, conservés dans leur flacon non ouvert et à 2...8 °C, peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Stabilité après reconstitution / ouverture:

Matériel/Réactif	État	Stockage	Stabilité
calibrateur et contrôles	après reconstitution	-20 °C	6 mois
ELISA test strip	Après ouverture	2... 8 °C sous film adhésif avec agent détissant dans un sac en plastique	Date de péremption
tampon de lavage concentré	Après ouverture	2... 8°C	6 mois
tampon de lavage	1+11,5 dilution du concentré	2... 8 °C	3 semaines
tampon d'incubation	Après ouverture	2... 8 °C	2 mois
Conjugué	Après ouverture	2... 8 °C	6 mois
	Solution conjugué prête à l'emploi	Température ambiante	60 minutes
substrat TMB	Après ouverture	2... 8 °C	Date de péremption

### PROCÉDURE DU TEST

#### PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Un plasma citraté ou EDTA devrait être utilisé. Centrifuger pendant 15 minutes à une vitesse minimum de 2500 g (DIN 58905). Les échantillons de plasmas doivent être stockés pendant 3 heures à température ambiante, ou doivent être immédiatement congelés après centrifugation. Les plasmas ainsi obtenus sont stables à -20°C pendant 6 mois. Eviter les cycles congélation / décongélation trop fréquents. Utiliser des échantillons de sérum est déconseillé.

#### PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- Tous les composants doivent être amenés à la température ambiante avant de commencer le test.
- Préparation du tampon de lavage: Diluer 1 vol de tampon de lavage concentré avec 11,5 vol d'eau distillée (1+11,5). Bien mélanger! Il se peut qu'il y ait des précipitation cristallines: celles-ci se dissolvent à 37°C en 10 minutes à température ambiante.
- Reconstitution des calibrateurs et des contrôles plasmatiques: Les calibrateurs et les contrôles plasmatiques sont reconstitués avec 500 µL d'eau distillée et mélangés pendant 10 secondes après 15 minutes de temps de reconstitution. Les composants ainsi reconstitués sont claires ou très légèrement troubles. Les contrôles plasmatiques normal et bas sont utilisés non dilués.  
Pour des échantillons ayant des hauts de D-Dimer de l'ordre de 15-20µg/ml, une dilution au 20<sup>e</sup> (20µl plasma test + 380µl tampon d'incubation) est recommandée. Pour des échantillons ayant des niveaux anormalement élevés, une dilution au 200<sup>e</sup> est recommandée.
- Préparer la solution conjugué prête à l'emploi (1+50): Diluer 1 vol de solution de conjugué concentré avec 50 vol de tampon d'incubation.

**Pour 8 puits de test: Mélanger 20 µL de conjugué concentré avec 1000 µL de tampon d'incubation.**

## PERFORMANCE DU TEST

Étape	Détails	Volume / Temps
INCUBATION DE L'ÉCHANTILLON (références 1, 2)	Calibrateurs dilués Contrôles plasmatiques dilués Échantillons dilués dans chaque puit. Couvrir les bandelettes avec un film.	100 µL
	Incuber à 37°C	60 minutes
LAVAGE (référence 1,3,4)	TAMPON DE LAVAGE	3 x 200 µL
RÉACTION DU CONJUGAT (référence 1,2)	Pipeter la solution de conjugué prête à l'emploi dans les puits, couvrir les bandelettes de test avec un film.	100 µL
	Incuber à 37°C	60 minutes
LAVAGE (référence 1,3,4)	TAMPON DE LAVAGE	3 x 200 µL
RÉACTION DU SUBSTRAT (référence 1,2)	pipeter la solution de substrat dans chaque puit. Couvrir les bandelettes avec un film.	100 µL
	Incuber à température ambiante	10 minutes
SOLUTION D'ARRÊT (référence 1,2)	pipeter la solution d'arrêt dans les puits	100 µL
MEASURE (référence 5)	Lecteur de plaque ELISA, 450 nm	Secouer 10 sec., Mesurer dans un intervalle de 10 minutes

#### Références:

- Ne pas utiliser ensemble des réactifs provenant de différents lots.
- Le bon déroulement et la précision du test dépendent des facteurs suivants:
  - Bien mélanger les substances utilisées lors des dilutions
  - Les standards, les contrôles et les échantillons doivent testés en dupliqué.
  - Les incubations doivent effectuées à la bonne température.
  - Respecter strictement l'ordre de pipetage et le temps pour chaque élément comme indiqué: le temps d'incubation des échantillons, conjugués, et substrat démarre après le pipetage du dernier échantillon. Les temps d'incubation ne doivent pas varier de +/- 10%.
  - Durant l'incubation de l'échantillon et la réaction du conjugué, le temps nécessaire au pipetage du calibrateur/échantillon/contrôle plasmatique dilué et/ou des solutions de conjugué, ne doivent pas excéder 60 secondes par bandelette de test ELISA (8 puits).
  - Durant la réaction du substrat et lors de l'arrêt de la réaction, le temps nécessaire au pipetage du substrat ne doit pas excéder 10 secondes par bandelette. Pour cela utiliser de préférence une pipette multi canal.
- Numéroté les bandelettes avec un feutre résistant à l'eau au cas où les bandes tombent accidentellement de la plaque durant le test.
- Après le dernier lavage, les puits doivent être rigoureusement secs: Pour cela positionner la plaque d'analyse sur du papier absorbant et taper doucement la plaque d'analyse
- Mesurer l'absorbance à 450 et 620 nm ou à 450 et 690 nm, la précision du test est alors augmentée

### LIMITES DU TEST

Le test ne peut pas être utilisé avec des échantillons de sérum. Une interférence avec d'autres produits de dégradation de la fibrine peut être exclue du fait de la spécificité de l'anticorps pour un néo antigène de la structure du D-Dimer.

### RÉSULTATS DU TEST

#### CALCUL DES RÉSULTATS

Établissement de la courbe de référence: Axe X : Concentration de D-Dimer ng/mL  
Axe Y : Absorbance

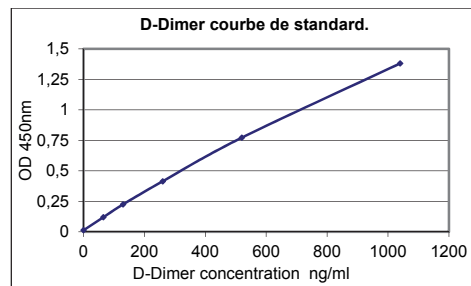
La courbe de référence est linéaire linéaire en linear ou cubic spline.

Évaluation de la courbe de référence:

- Le coefficient de la courbe d'extinction du calibrateur le plus grand devrait se situer entre 1,0 et 2,5.

- La validité du test doit être vérifiée sur la base des valeurs calculées des contrôles

Exemple de courbe de référence :



#### Mesure des concentrations des échantillons:

- Lire la concentration à partir de la courbe de référence.
- Si des échantillons présentent un coefficient d'extinction supérieur à celui du plus haut point de la courbe de référence, il doit alors être pré dilué avec le tampon d'incubation, et la concentration mesurée doit alors être multipliée.

### GAMME DE RÉFÉRENCE

La gamme normale de référence est comprise entre 0 – 250 ng/mL (N=148). Il est recommandé que les différents laboratoires établissent leur propre gamme.

### STANDARDISATION

Il n'existe pas de standard international du D-Dimer, les standards de Technoclone ayant été calibrés à l'aide des standards de un commercial D-Dimer latex assay.

### LITTÉRATURE

- Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonization of D-dimer assays; SSC Communication. Thromb Haemostas 1997; 77: 1031-3

**ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА**

**НАЗНАЧЕНИЕ**

TECHNOZYM® D-Dimer ELISA может быть использован для определения концентрации D-димеров в плазме. D-димеры генерируются как специфические растворимые продукты деградации в процессе фибринолиза. Повышенные уровни D-димеров обнаруживаются в случае диссеминированной внутрисосудистой коагуляции (DIC), тромбоз глубоких вен (DVT) и легочной эмболии (PE), но другие обстоятельства также могут приводить к высоким уровням D-димеров, такие как пожилой возраст, беременность, рак, заболевания печени и инфекции. ИФА система имеет высокую чувствительность по сравнению с латексным агглютинативным тестом, поэтому дает лучшую помощь в диагностике исключения тромбоза глубоких вен (VTE).

**СОСТАВ**

- ИФА тест-стрипы (12), по 8 лунок каждый, покрытые анти-D-димер моноклональными антителами; осушающий агент в алюминиевом пакете.
- Концентрат промывочного буфера (PBS; pH 7,3); содержащий детергент; 0,01% мертиолат; 1 флакон, 80 мл.
- Инкубационный буфер (PBS; pH 7,3); содержащий белок-стабилизатор; 0,05% проклина; и голубой краситель, 1 флакон, 90 мл, готов к использованию.
- Калибраторы (Стандарты) пронумерованные 1-5; лиофилизированные, 1 флакон каждого. Концентрации лот-специфичны; см. наклейки на флаконах.
- Контрольные плазмы «низкий» и «высокий» уровень, лиофилизированные, 1 флакон каждой. Концентрации лот-специфичны; см. наклейки на флаконах.
- Конъюгат моноклональный анти-D-димер-пероксидаза; синяя окраска; 1 флакон, 0,3 мл.
- Хромоген TMB (тетраметилбензидин); 1 флакон, 12 мл; готов к использованию.
- Стоп-раствор: серная кислота 0,45 моль/л; 1 флакон 12 мл; готов к использованию.
- Адгезивная пленка для ИФА тест-стрипов (2).

**ПОТРЕБУЮТСЯ МАТЕРИАЛЫ** (не входят в набор)

- Дистиллированная вода
- Тест-пробирки для разведения стандартов и проб
- Мерный цилиндр (1000 мл)
- прецизионные пипетки (10, 100 и 1000 мкл)
- Варипипетка (1000 мкл)
- Многоканальные пипетки, и/или диспенсер (100 и 200 мкл)
- ИФА промыватель, или многоканальная пипетка
- ИФА ридер со светофильтрами 450 и 620 нм.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ**

- Все продукты из человеческой крови или плазмы, а также пробы должны рассматриваться как потенциально инфицированные. Обращаться с ними следует осторожно и в строгом соответствии с правилами безопасности. Правила утилизации такие же, как для больничных отходов.
- Калибраторы и контрольные плазмы сделаны из человеческой крови и любая индивидуальная плазма включенная в процедуру являются отрицательными по HbsAg, HIV 1/2 Ab и HCV-Ab (см. наклейки на флаконах). Однако, со всеми продуктами из человеческой крови следует обращаться, как с потенциально инфицированным материалом.
- Стоп-раствор (серная кислота) может раздражать кожу. Если кислота попала в глаз, немедленно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Реагенты иногда содержат консерванты (мертиолат). Избегайте заглатывания! Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.

**СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ**

Срок годности напечатанный на наклейках относится к невскрытым флаконам хранящимся при +2-8 °C. Стабильность после растворения/вскрытия:

Материал/Реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Калибраторы, Контрольные плазмы	После растворения	-20 °C	6 месяцев
ИФА тест-стрипы	После вскрытия	2 - 8 °C с адгезивной пленкой в пластиковом пакете с осушителем	До срока годности
Концентрат промывочного буфера	После вскрытия	2 - 8 °C	6 месяцев
Промывочный буфер	разведенный концентрат 1+11,5	2 - 8 °C	3 недели
Инкубационный буфер	После вскрытия	2 - 8 °C	2 месяца
Конъюгат	После вскрытия Рабочий раствор	2 - 8 °C Комнатная температура	6 месяцев 60 минут
Хромоген-субстрат	После вскрытия	2 - 8 °C	До срока годности

**ТЕСТ-ПРОЦЕДУРА**

**ПОДГОТОВКА ПРОБ**

Материал пробы: Плазма.  
Должна использоваться плазма с цитратом. Получение плазмы: смешайте 9 частей венозной крови с 1 частью раствора цитрата натрия (0,11 моль/л) и центрифугируйте 15 минут при минимум 2500 g (DIN 58905). Пробы плазмы могут храниться до 3 часов при комнатной температуре; в противном случае пробы следует заморозить немедленно после центрифугирования. Стабильность при -20°C до 6 месяцев. Избегайте повторных циклов размораживания-замораживания. Использовать пробы сыворотки не рекомендуется.

**ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

- Перед началом тестирования все необходимые компоненты должны быть доведены до комнатной температуры.
- Подготовка промывочного буфера: Разбавьте 1 часть концентрата промывочного буфера 11,5 частями дистиллированной воды (1+11,5). Хорошо перемешайте! (разбавленный концентрат промывочного буфера = промывочный буфер) Может быть кристаллический осадок, который растворится при 37°C в течение 10 минут.
- Растворение калибраторов и контрольных плазм: Калибраторы и контрольные плазмы растворяются в 0,5 мл дистиллированной воды и перемешиваются 10 секунд на вортексе. Дайте постоять 15 минут. Растворенные компоненты прозрачные, слегка мутноватые. Контрольные плазмы нормального и пробы низкого уровня используются неразбавленными. Для проб высокого уровня (до 15-20 мкг/мл) рекомендуется разведение 1:20 (20 мкл плазмы + 380 мкл инкубационного буфера), для аномально высоких уровней разбавьте 1:200 (40 мкл плазмы +360 мкл инкубационного буфера).
- Приготовление рабочего раствора конъюгата (1+50): Разбавьте 1 часть конъюгата 50 частями инкубационного буфера

**Для 8 лунок: Смешайте 20 мкл конъюгата с 1000 мкл инкубационного буфера**

**ВЫПОЛНЕНИЕ ТЕСТА**

<b>ИНКУБАЦИЯ ПРОБ</b> (ссылки 1,2)	Пипетируйте калибраторы, контрольные плазмы, пробы в лунки, закройте стрипы пленкой	100 мкл
	Инкубируйте при 37°C	60 минут
<b>ПРОМЫВКА</b> (ссылки 1,3,4)	Промывочный буфер	3 x 200 мкл
<b>РЕАКЦИЯ С КОНЬЮГАТОМ</b> (ссылки 1,2)	Пипетируйте рабочий раствор конъюгата в лунки, закройте стрипы пленкой	100 мкл
	Инкубируйте при 37°C	60 минут
<b>ПРОМЫВКА</b> (ссылки 1,3,4)	Промывочный буфер	3 x 200 мкл
<b>РЕАКЦИЯ С СУБСТРАТОМ</b> (ссылки 1,2)	Пипетируйте раствор субстрата в лунки, закройте стрипы пленкой	100 мкл
	Инкубируйте при комнатной температуре	10 минут
<b>ОСТАНОВКА</b> (ссылки 1,2)	Пипетируйте стоп-раствор в лунки	100 мкл
<b>ИЗМЕРЕНИЕ</b> (ссылка 5)	ИФА ридер, 450 нм	Перед измерением встряхните 10 сек, измерьте в течение 10 минут.

**ССЫЛКИ**

- Реагенты из разных лотов не должны комбинироваться
- Точность и воспроизводимость наряду с другими зависит от следующих факторов:
  - Перемешивайте все вещества, используемые для разведения (10 минут на вортексе)
  - Тестируйте калибраторы, контроли и пробы в дублях
  - Инкубируйте при указанной температуре (комнатная температура 20 -25°C)
  - Строго соблюдайте порядок пипетирования и время, как указано.
  - Время инкубации проб, конъюгата и реакция с субстратом отсчитывается от момента пипетирования последней пробы. Время инкубации не должно варьироваться более чем ±5%.
  - Пипетирование проб для инкубации и конъюгата для реакции с ним не должно превышать 60 секунд на тест-стрип (8 лунок).
  - Для реакции с субстратом время пипетирования субстрата и стоп-раствора не должно превышать 10 секунд на тест-стрип (8 лунок). Сокращение времени пипетирования достигается использованием многоканальной пипетки.
- Помечайте номера стрипов водостойким карандашом на случай их выпадения из рамки в процессе анализа.
- После последней промывки для полного удаления жидкости из лунок переверните плашку и легонько постучайте ею по фильтровальной бумаге.
- Измерение при двух длинах волн 450 и 620 нм повышает точность теста.

**ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА**

Тест не может использоваться для проб сыворотки. Интерференция с другими продуктами деградации фибрина может быть полностью исключена, поскольку используемые антитела являются специфичными к нео-антигену структуры D-димера.

**РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА**

**РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ**

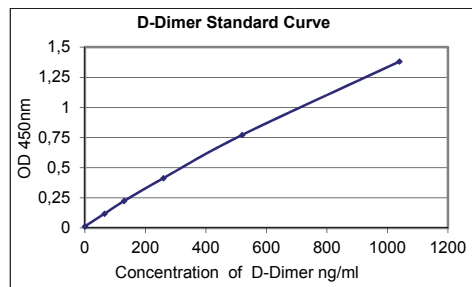
Построение калибровочной кривой: по оси X: Концентрация D-димеров нг/мл  
По оси Y: поглощение

График строится на миллиметровой бумаге с линейными осями с аппроксимацией от точки к точке, или кубической.

**Оценка калибровочной кривой**

- Поглощение наивысшего калибратора должно быть между 1,0 и 2,5.
- Правильность теста может быть проверена по контрольным материалам.

**Пример калибровочной кривой**



**Измерение концентрации проб**

- Считайте концентрацию с калибровочной кривой.
- Если есть пробы с поглощением выше, чем наивысшая точка кривой, их следует разбавить инкубационным буфером. Измеренная концентрация должна быть умножена на фактор разведения.

**ДИАПАЗОН НОРМЫ**

Диапазон нормы для D-димеров установлен между 0 и 250 нг/мл (n = 148). Каждой лаборатории рекомендуется установить собственные нормы.

**СТАНДАРТИЗАЦИЯ**

Для D-димеров нет международных стандартов. Стандарты фирмы Technoclone калибруются по стандартам коммерческого D-Dimer Latex assay.

**ЛИТЕРАТУРА**

- Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonization of D-dimer assays; SSC Communication. Thromb Haemostas 1997; 77: 1031-3