

«УТВЕРЖДЕНА»

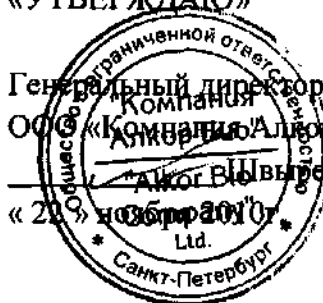
Приказом Росздравнадзора

от «__» _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»

«Алкор Био» Швырев М.В.
«21» ноября 2010 г.



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПРОИНСУЛИНА
В ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОМ ИНСУЛИНЕ ЧЕЛОВЕКА
(«ПанкреоИФА-проинсулин»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ПанкреоИФА-проинсулин» предназначен для количественного определения проинсулина в генно-инженерном инсулине человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Проинсулин — предшественник инсулина, основного гормона, ответственного за метаболизм глюкозы. Синтез проинсулина происходит в β -клетках островков Лангерганса из белка-предшественника (препроинсулина). Молекула проинсулина состоит из 86-аминокислотного одноцепочечного полипептида ($M=9390$ Да) с тремя дисульфидными мостиками. В молекуле выделяют 3 участка: α -цепь инсулина, содержащую 21 аминокислоту (АК), β -цепь инсулина (30 АК) и С-пептид (31 АК).

В соответствии с требованиями фармакопей различных стран, включая фармакопею Российской Федерации, для лечения больных сахарным диабетом рекомендуется использование только монокомпонентных препаратов инсулина свиньи и человека. Степень очистки таких препаратов — до 10 ppm (количество весовых частей проинсулина на миллион весовых частей инсулина). Некоторые фирмы производят монокомпонентные инсулины, в которых содержание проинсулина не превышает 1 ppm.

Необходимым требованием к качеству лекарственных препаратов инсулина является высокая степень чистоты. Отсутствие примесей проинсулина во вводимом препарате предотвращает развитие иммунного ответа и позволяет сохранить эффективность инсулинотерапии. Поэтому необходим высокоэффективный контроль чистоты получаемых продуктов.

1.3. Набор «ПанкреоИФА-проинсулин» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной, 6 калибровочных проб и одной контрольной пробы при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ПанкреоИФА-проинсулин» использован «сэндвич» - вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к проинсулину. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца, во время первой инкубации происходит связывание проинсулина с моноклональными антителами к проинсулину, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа иммобилизованный проинсулин взаимодействует с конъюгатом моноклональных антител к проинсулину человека с пероксидазой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству проинсулина в исследуемом образце (Рисунок 1).

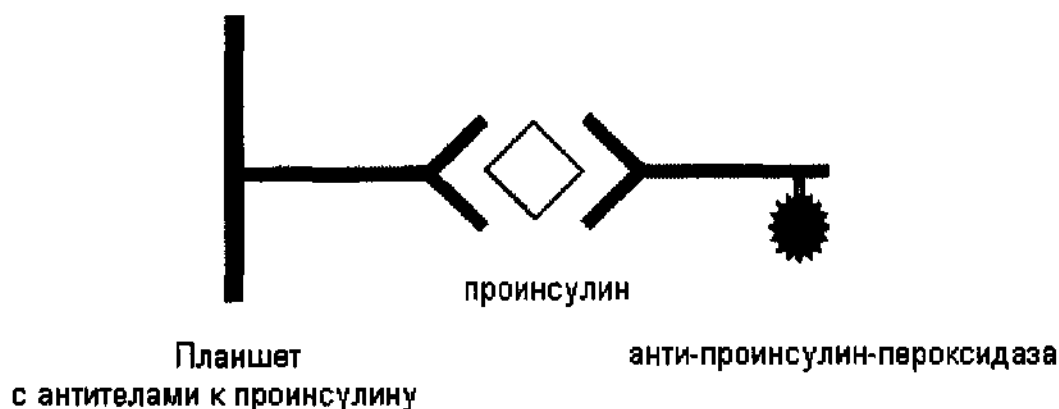


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации проинсулина в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация проинсулина в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к проинсулину человека, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к проинсулину» – 1 упаковка;
- калибровочные пробы, аттестованные по Первому международному стандарту IRP 84/611 на проинсулин человека, содержащие известные количества проинсулина. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций проинсулина в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 0,5; 1; 2; 5 и 10 нг/мл – 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 1,0 мл);
- водно-солевой раствор для разведения образцов инсулина, маркирован «Буфер Д» — 2 флакона (200 мл);

- конъюгат анти-проинсулин-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 2 флакона (14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная проба с известным содержанием проинсулина человека, маркирована «Контрольная проба» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 1,0 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к проинсулину человека с инсулинами человека, свиньи и крупного рогатого скота (КРС); проинсулинами свиньи и КРС; С-пептидом человека.

3.2. Коэффициент вариации результатов определения проинсулина в одном и том же препарате инсулина с использованием набора «ПанкреоИФА-проинсулин» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации проинсулина в препаратах инсулина при разведении их буфером Д, не содержащим проинсулин, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» проинсулина — проверка соответствия значения определяемой концентрации проинсулина расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной пробы и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110 %.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация проинсулина в препаратах инсулина человека не превышает 0,3 нг/мл.

Примечание: В наборе «ПанкреоИФА-проинсулин» значения концентраций калибровочных проб выражены в нг/мл. Для пересчета содержания проинсулина в генно-инженерном инсулине в ррт необходимо значение концентрации проинсулина в образце в нг/мл умножить на 3,33.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 1.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндры мерные, позволяющие отмерять 10, 50 и 600 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Подготовка 0,01 Н и 0,1 Н раствора соляной кислоты. Для подготовки образцов инсулина возможно использование входящей в состав набора 1 Н соляной кислоты (стоп-реагента), предварительно разведенной дистиллированной водой. Для исследования препаратов инсулина в виде субстанции-порошка следует приготовить 0,01 Н раствор соляной кислоты. Для исследования препаратов инсулина в виде суспензии следует приготовить 0,1 Н раствор соляной кислоты. Количества стоп-реагента и дистиллированной воды, необходимые для приготовления раствора соляной кислоты необходимой концентрации в зависимости от числа исследуемых образцов, указаны в таблице 1.

Таблица 1

Число исследуемых образцов инсулина	0,1 Н соляная кислота		0,01 Н соляная кислота	
	Стоп-реагент, мл	Дистиллированная вода, мл	Стоп-реагент, мл	Дистиллированная вода, мл
10	0,2	1,8	0,2	19,8
20	0,4	3,6	0,3	29,7
30	0,6	5,4	0,4	39,6
41	0,8	7,2	0,5	49,5

6.2. Перед проведением анализа все исследуемые препараты генно-инженерного инсулина должны быть подготовлены по одной из нижеприведенных методик в зависимости от их формы выпуска:

Субстанция-порошок. Растворить 3 мг препарата инсулина в 1 мл 0,01 Н соляной кислоты, перемешать до образования прозрачного раствора. К полученному раствору добавить 9 мл буфера Д. Тщательно перемешать.

Суспензия. Тщательно перемешать образец инсулина, несколько раз осторожно переворачивая флакон до равномерного помутнения содержимого по всему объему. В зависимости от концентрации инсулина в исходном препарате отобрать необходимый

объем образца, добавить 0,1 Н соляную кислоту и перемешать до образования *прозрачного раствора*. К полученному раствору добавить буфер Д. Тщательно перемешать. Необходимые объемы реагентов указаны в таблице 2.

Таблица 2

Количество реагентов	Концентрация инсулина в суспензии	
	40 Ед/мл	100 Ед/мл
Образец инсулина, мкл	750	300
0,1 Н соляная кислота, мкл	150	60
Буфер Д, мкл	3100	3640

Раствор. В зависимости от концентрации инсулина в исходном препарате отобрать необходимый объем образца, добавить буфер Д и тщательно перемешать. Необходимые объемы реагентов указаны в таблице 3.

Таблица 3

Количество реагентов	Концентрация инсулина в растворе	
	40 Ед/мл	100 Ед/мл
Образец инсулина, мкл	150	60
Буфер Д, мкл	650	740

Разводить образцы инсулина следует только в день проведения анализа.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные и контрольная пробы готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных и контрольной проб перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной и контрольной пробой внести по 1,0 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 20 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат Е готов к использованию. Расход конъюгата Е на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.4. Буфер Д готов к использованию.

7.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р+95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.6. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.8. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

В приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – №1 – для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы №1;
B1, B2 – №2 – для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы №2;
C1, C2 – №3 – для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы №3;
D1, D2 – №4 – для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы №4;
E1, E2 – №5 – для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы №5;
F1, F2 – №6 – для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы №6;
G1, G2 – №7 – для измерения величины оптической плотности контрольной пробы.

7.2.2. Внести в соответствующие лунки по 200 мкл калибровочных и контрольной проб, в оставшиеся лунки – по 200 мкл исследуемых препаратов инсулина в дубликатах, приготовленных по п. 6.2.

Примечание: общее время внесения калибровочных проб, контрольной пробы и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации различных образцов будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.3. Инкубировать стрипы в течение 1 часа при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500-800 об/мин.

7.2.4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки 5 раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.5., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5-10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.5. Во все лунки немедленно внести по 120 мкл конъюгата Е.

7.2.6. Инкубировать стрипы согласно п. 7.2.3.

7.2.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки согласно п. 7.2.4.

7.2.8. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

Примечание: максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.

7.2.9. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, перемешать на шейкере в течение 1-2 минут при комнатной температуре (+18...25°C).

7.2.10. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.9., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при температуре +18...25°C.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех лунок.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации проинсулина (нг/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».

Примечание 2: для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок A1 и A2.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_1,$$

где B – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,

B_1 – среднее арифметическое значение оптической плотности лунок A1 и A2.

9.2. Определить содержание проинсулина в пробах по калибровочному графику.

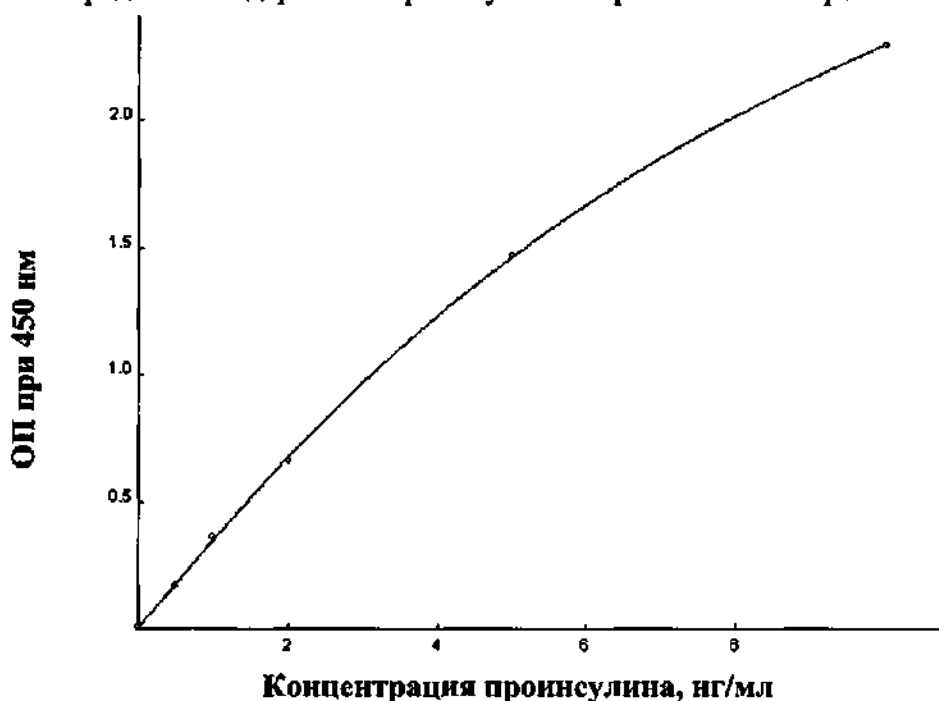


Рисунок 2. Типичный калибровочный график
Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ПанкреоИФА-проинсулин» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;

- жидкие, готовые к использованию, калибровочные и контрольную пробы после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные и контрольную пробы хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- конъюгат Е, буфер Д и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток;

- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (2 эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации проинсулина в контрольной пробе;

- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;

- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ПанкреоИФА-проинсулин» следует обращаться по адресу: г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70, тел/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»



Иванов М.В.

Руководитель лаборатории разработки
ИФА-систем ООО «Компания Алкор Био»

Сусорова А.С.

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.
_____ 2010 г.

Рисова



СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	200 мкл КП и контрольной пробы	КТ +18 ...25°C	Внесение КП, контрольной пробы и исследуемых образцов не более 15'	
2		200 мкл исследуемых образцов			
3	Инкубация №1	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500-800об/мин
4	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р+266 мл H ₂ O
5	Внесение конъюгата	120 мкл конъюгата анти-проинсулин-пероксидаза			
5	Инкубация №2	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500-800об/мин
6	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р+266 мл H ₂ O
7	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
8	Инкубация с ТМБ	—	КТ	15' - 30'	В темноте
9	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
10	Перемешивание		КТ	1 - 2'	шейкер
11	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм
12	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/соответствующее ПО

Примечания: КП — калибровочная проба; ОП — оптическая плотность; КТ — комнатная температура (+18...25°C);

ПО — программное обеспечение.

Ирошито, пронумеровано, скреплено
печатью 10 (десять) листов

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
 М.В. Швырев