«УТВЕРЖДЕНА»
Приказом Росздравнадзора
от «30» августа 2012г. № 1120-Пр/12

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ **РАКОВОГО АНТИГЕНА СА 15-3** В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА **(«ОнкоИФА-СА 15-3»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ОнкоИФА-СА 15-3» предназначен для количественного определения ракового антигена СА 15-3 в сыворотке и плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. При исследовании на СА 15-3 измеряется концентрация белкового продукта гена MUC1. СА 15-3 - большой трансмембранный гликозилированный белок, содержащий три основных домена: большой внеклеточный участок, внутримембранную последовательность и цитоплазматический домен. Хотя физиологическая функция белка MUC1 до конца не выяснена, показано, что этот

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

гликопротеин вовлечен в процессы межклеточной адгезии, иммунные реакции и образование метастазов. По сравнению со здоровой тканью молочной железы, в ткани карциномы молочной железы белок MUC1 определяется в более высокой концентрации, но отличается меньшей степенью гликозилирования.

Повышенные концентрации СА 15-3 отмечают при раке легкого, яичников, прямой кишки. Однако известно, что у 2 % здоровых женщин концентрация СА 15-3 может быть повышена. Также есть данные, что у 7 % пациентов с незлокачественными заболеваниями отмечают повышенные концентрации СА 15-3. Поэтому с клинической точки зрения определение только концентрации СА 15-3 не имеет диагностической ценности при тестировании на наличие злокачественных новообразований. Этот результат следует использовать только в сочетании с иными клиническими проявлениями, результатами наблюдений и диагностическими параметрами.

В настоящее время наиболее важным клиническим применением определения СА 15-3 является мониторинговая терапия пациентов с распространенным раком молочной железы, который невозможно оценить иными клиническими или радиологическими методами. Для прогнозирования течения заболевания у пациентов с впервые диагностированным раком молочной железы необходимо рассматривать данные о концентрации СА 15-3 до операции в сочетании с иными прогностическими факторами.

1.3. Набор «ОнкоИФА-СА 15-3» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для

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

определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: *в случае дробного применения набор может быть использован только в течение 1,5 месяцев после вскрытия компонентов набора.*

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ОнкоИФА-СА 15-3» использован двухстадийный «сэндвич» - вариант твердофазного иммуноферментного анализа (Рисунок 1). На первой стадии анализа СА 15-3, содержащийся в контрольной сыворотке, калибровочных и исследуемых пробах, связывается с моноклональными антителами к СА 15-3, конъюгированными с биотином (на Рисунке 1: МАТ1-биотин). В результате реакции образуется комплекс, который, в свою очередь, связывается со стрептавидином, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок. При удалении промывкой содержимого из лунок происходит разделение свободных и связанных антителами белков сыворотки и плазмы крови. На второй стадии анализа при добавлении конъюгата, содержащего моноклональные антитела, специфичные к другому эпитопу молекулы СА 15-3, меченное пероксидазой хрена антитело (на Рисунке 1: МАТ2-пероксидаза) связывается с молекулами СА 15-3, которые ранее были иммобилизованы во время первой инкубации.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации СА 15-3 в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация СА 15-3 в исследуемых образцах.

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

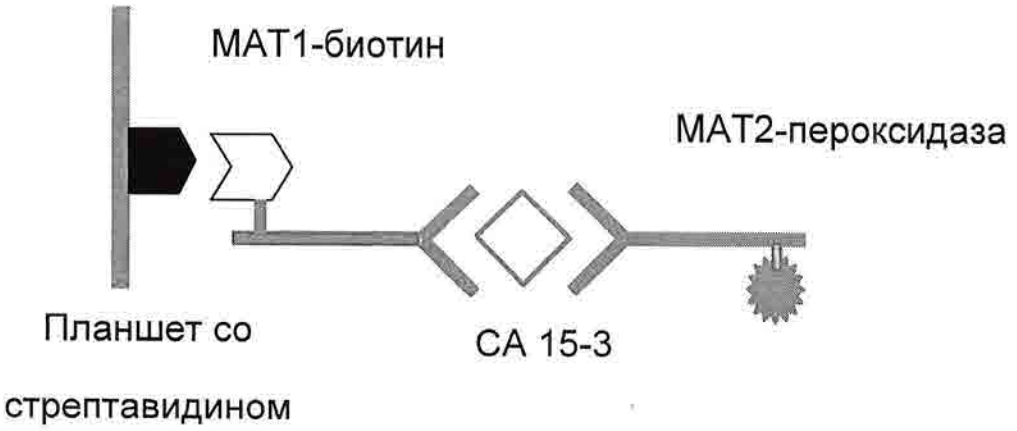


Рисунок 1. Схема анализа

2.2. Состав набора

• комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок стрептавидином, маркирован «Стрипы с иммобилизованным стрептавидином» – 1 упаковка;

• калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества СА 15-3. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций СА 15-3 в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 10; 40; 100; 200; 400 Ед/мл – 6 флаконов (лиофилизованные препараты или жидкости по 1,0 мл);

• конъюгат, содержащий моноклональные антитела к СА 15-3 с биотином, маркирован «Конъюгат Е №1» – 1 флакон (12 мл);

• конъюгат, содержащий моноклональные антитела к СА 15-3 с пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат Е №2» – 1 флакон (12 мл);

• концентрированный водно-солевой раствор для

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

промывки лунок, маркирован «Буфер М» – 1 флакон (20 мл);

- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки и плазмы крови, маркирован «Буфер Д» – 1 флакон (50 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием СА 15-3, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 флакон (лиофилизованный препарат или жидкость 0,5 мл).

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к СА 15-3 с другими аналитами и интерференция приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Вещество	Исследованная концентрация	Перекрестная реакция
СА 15-3	-	100%
СА 125	10 000 Ед/мл	0,1%
СА 19-9	5 000 Ед/мл	0,1%
ПСА	1000 нг/мл	2,6%
АФП	30 000 нг/мл	Не определяется
РЭА	5 000 нг/мл	Не определяется
ХГч	125 000 мМЕ/мл	Не определяется
Ревматоидный фактор	12 500 МЕ/мл	0,1%
Билирубин	200 мкг/мл	Не определяется
Продукты гемолиза	30 мкл/мл	Не определяется
Липиды	50 мкг/мл	0,9%

3.2. Коэффициент вариации результатов определения СА 15-3 в одном и том же образце с использованием набора «ОнкоИФА-СА 15-3» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации СА 15-3 в исследуемых образцах при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверя-

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

ется тестом на «открытие» СА 15-3 — проверка соответствия значения определяемой концентрации СА 15-3 расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов калибровочной пробы №3 и контрольной сыворотки. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация СА 15-3 в сыворотке и плазме крови человека не превышает 0,2 Ед/мл.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ОнкоИФА-СА 15-3» хук-эффект не наблюдается.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. У большинства здоровых женщин концентрация СА 15-3 ≤ 37 Ед/мл.

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будет определен диапазон ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

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

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 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. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

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

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм, 405 нм и 620 нм (референтная длина волны). Применение длины волны 620 нм не является обязательным, но предпочтительнее, поскольку позволяет обнаружить интерференцию пластика;
- 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;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

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

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт. После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре +2...8°С не более 5 суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20°С и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

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

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизованных калибровочных проб и контрольной сыворотки 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 пробой внести по 1 мл дистиллированной воды, во флакон с контрольной сывороткой – 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре 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. Буфер Д готов к использованию.

7.1.4. Конъюгат Е №1, Конъюгат Е №2 готовы к использованию. Расход конъюгатов на один стрип составляет по 1,0 мл.

7.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера М развести дистиллированной водой в 50 раз.

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

Например:

5 мл буфера М + 245 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.6. Раствор 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 0,75 мл.

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

7.1.9. Разведение исследуемых образцов.

Перед проведением анализа все исследуемые образцы (за исключением калибровочных проб и контрольной сыворотки) должны быть разведены буфером Д в 21 раз:

500 мкл буфера Д + 25 мкл исследуемого образца.

При разведении необходимо тщательное перемешивание.

Если по предварительным данным или по результатам анализа (см. **п.9.3.**) значения концентраций СА 15-3 в исследуемых образцах выше КП №6, образцы следует дополнительно развести буфером Д в 10 раз и более.

На странице 22 приведена схема проведения анализа.

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

7.2. Постановка анализа

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

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 – № 5 - для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 – № 6 - для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 – № 7 - для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 – № 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Внести в соответствующие лунки по 25 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки – по 25 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов в дубликатах.

***Примечание**: общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

7.2.3. Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 100 мкл конъюгата E №1.

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

Примечание: *Чрезвычайно важно вносить все реагенты как можно ближе ко дну покрытой стрептавидином лунки.*

7.2.4. Перемешать реагенты в лунках аккуратным постукиванием рамки со стрипами в течение 20-30 секунд.

7.2.5. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при комнатной температуре (+18...25°С) в темноте без шейкирования.

7.2.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавлять 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.

7.2.7. Внести во все лунки, кроме А1 и А2, по 100 мкл конъюгата Е №2.

7.2.8. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°С) в течение 60 минут без шейкирования.

7.2.9. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок путем декантирования или аспирации и промыть лунки согласно **п.7.2.6.**

7.2.10. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 15-30 минут в зависимости

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

от степени развития окраски.

7.2.11. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 50 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции и осторожно перемешать реагенты в лунках аккуратным постукиванием рамки со стрипами в течение 15-20 секунд.

7.2.12. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. **7.2.11**, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре (+18…25°С).

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.*

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Если оптическая плотность калибровочной пробы №6 превышает предел линейного измерения фотометра, необходимо переизмерить оптическую плотность в лунках при длине волны 405 нм.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

***Примечание**: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП при 450 нм.*

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации СА 15-3 (Ед/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: *при применении референтной длины волны 620 нм оптическую плотность каждой калибровочной пробы, полученную при 620 нм, вычитают из оптической плотности, полученной при основной длине волны, эти значения используют для построения калибровочного графика.*

Примечание 2: *для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».*

Примечание 3: *для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.*

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B–B_T,$$

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

B_T *- среднее арифметическое значение оптической плотности лунок А1 и А2.*

9.2. Определить содержание СА 15-3 в пробах по

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

калибровочному графику. В случае дополнительного разведения образца необходимо измеренную концентрацию СА 15-3 умножить на фактор разведения.

9.3. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации СА 15-3, превышающих номинал КП №6, не допускается. Для точного определения концентрации СА 15-3 в таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с п. **7.1.9**.

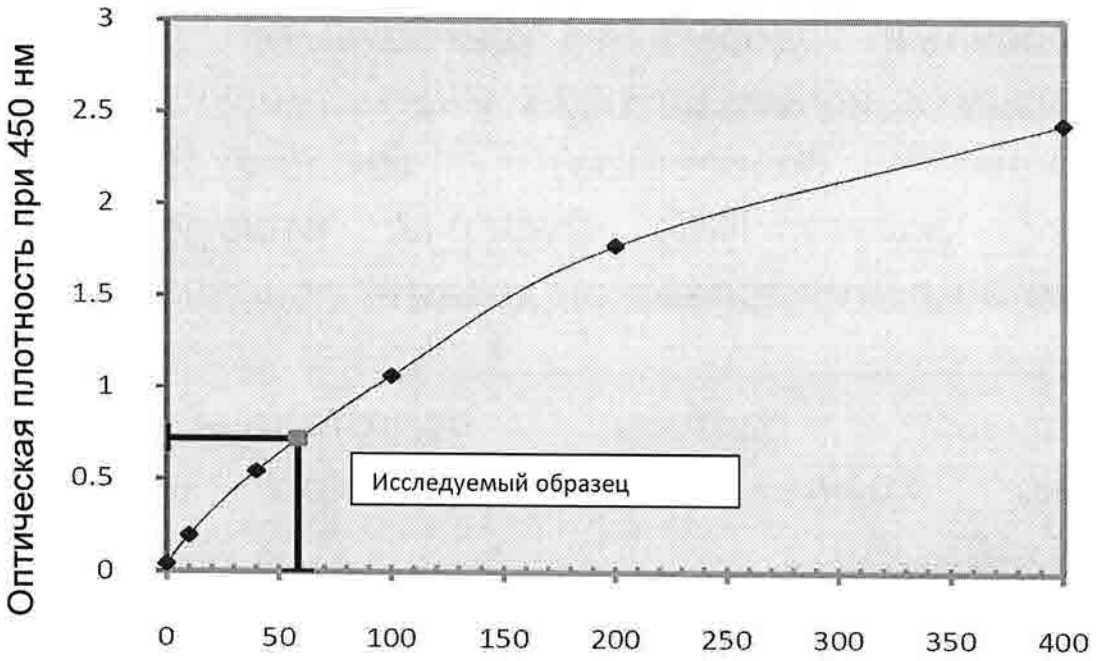


Рисунок 2.Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ОнкоИФА-СА 15-3» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2…8°С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

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

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 возможно хранить в течение 1,5 месяцев следующим образом:

- стрипы поместить обратно в пакет из алюминиевой фольги, плотно закрыть и хранить при температуре +2…8°С;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку (жидкие, готовые к использованию и восстановленные из лиофилизованных препаратов), конъюгат Е №1, конъюгат Е №2, раствор ТМБ, буфер М, стоп-реагент и буфер Д после вскрытия флаконов хранить при температуре +2…8°С;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18…25°С).

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

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации СА 15-3 в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгатов, 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

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

закрывать крышки флаконов и помещать их в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Запрещается использовать промывочный раствор, стоп-реагент, ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.6. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ и стоп-реагента, входящих в состав данного набора.

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

10.9. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

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

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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	**25 мкл** *КП и КС*	**КТ**	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		**25 мкл** *предварительно разведенных исследуемых образцов*			
3		**100 мкл** *коньюгата Е №1*			
4	**Инкубация №1**	—	**КТ**	В темноте, 60', без шейкирования	Перед инкубацией перемешать 20-30 секунд
5	Промывка	**300 мкл** в лунку *1*промывочного раствора* (5 раз)			**1***промывочный раствор = = 20 мл буфера М+980 мл H_2O
6	Внесение реагента	**100 мкл** *коньюгата Е №2*	**КТ**		В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
7	**Инкубация №2**	—	**КТ**	В темноте, 60', без шейкирования	
8	Промывка	**300 мкл** в лунку *1*промывочного раствора* (5 раз)			**1***промывочный раствор = = 20 мл буфера М+980 мл H_2O
9	Внесение хромогена	**100 мкл** *ТМБ*			
10	**Инкубация с ТМБ**	—	**КТ**	15 - 30'	В темноте
11	Остановка ферментной реакции	**50 мкл** *стоп-реагента*			
12	Перемешивание		**КТ**	15 - 20 секунд	
13	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	**Фотометр,** 450 нм, 405 нм (см п.8) (620 нм)
14	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/соответствующее ПО

Примечания:

КП – калибровочная проба;

КС – контрольная сыворотка;

ОП – оптическая плотность;

КТ – комнатная температура (+18…25°С);

ПО – программное обеспечение.

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

По вопросам качества набора «ОнкоИФА–СА 15-3» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, Лит. А, тел/факс: (812) 677-87-79.

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