

«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора
от « 13 » июля 2011г. № 4124-П/11

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ВичИФА-анти-НIV-1,2»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ВичИФА-анти-НIV-1,2» предназначен для качественного определения антител к ВИЧ-1,2 в сыворотке и плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ВИЧ-инфекция представляет собой медленно прогрессирующее инфекционное заболевание, возникающее вследствие заражения вирусом иммунодефицита человека. Вирус иммунодефицита человека относится к семейству РНК-содержащих ретровирусов. Описаны 2 типа вируса – ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Источником инфекции являются инфицированные люди – больные СПИДом и «вирусоносители». Вирус передается при половых контактах, переливании зараженной крови и ее препаратов, повторном использовании инфицированного медицинского инструментария. Возможен также вертикальный механизм передачи возбудителя (трансплацентарный).

Антитела к ВИЧ появляются у 90-95 % инфицированных в течение 3 месяцев после заражения, у 5-9 % - через 6 месяцев от момента заражения и у 0,5 – 1 % - в более поздние сроки.

Согласно «Методическим рекомендациям о проведении обследования на ВИЧ-инфекцию» образцы крови, дающие воспроизводимо положительный результат на наличие антител к ВИЧ-1,2, должны быть проверены с использованием подтверждающего метода (иммунный блот) или группы подтверждающих методов, включая иммунный блот.

1.3. Набор «ВичИФА-анти-НIV-1,2» выпускается в двух вариантах комплектации.

Комплектация на 96 определений рассчитана на проведение анализа в дубликатах 44 неизвестных проб при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Комплектация на 192 определения рассчитана на проведение анализа в дубликатах 88 неизвестных проб при использовании всего комплекта стрипов одновременно.

Обратите внимание, что при каждой постановке анализа обязательно нужно определять оптические плотности (ОП) контрольных проб и раствора ТМБ в соответствии со схемой маркировки лунок (п. 7.2.1.) .

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 «ВичИФА-анти-HIV-1,2» использован «сэндвич» - вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы рекомбинантные антигены ВИЧ-1 (gp41) и ВИЧ-2 (gp36), которые иммобилизованы на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), а также конъюгированы с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата gp41-gp36-пероксидаза во время инкубации одновременно происходит иммобилизация антител к ВИЧ-1,2, содержащихся в исследуемом образце, и связывание образовавшегося комплекса с конъюгатом.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой (Рисунок 1).

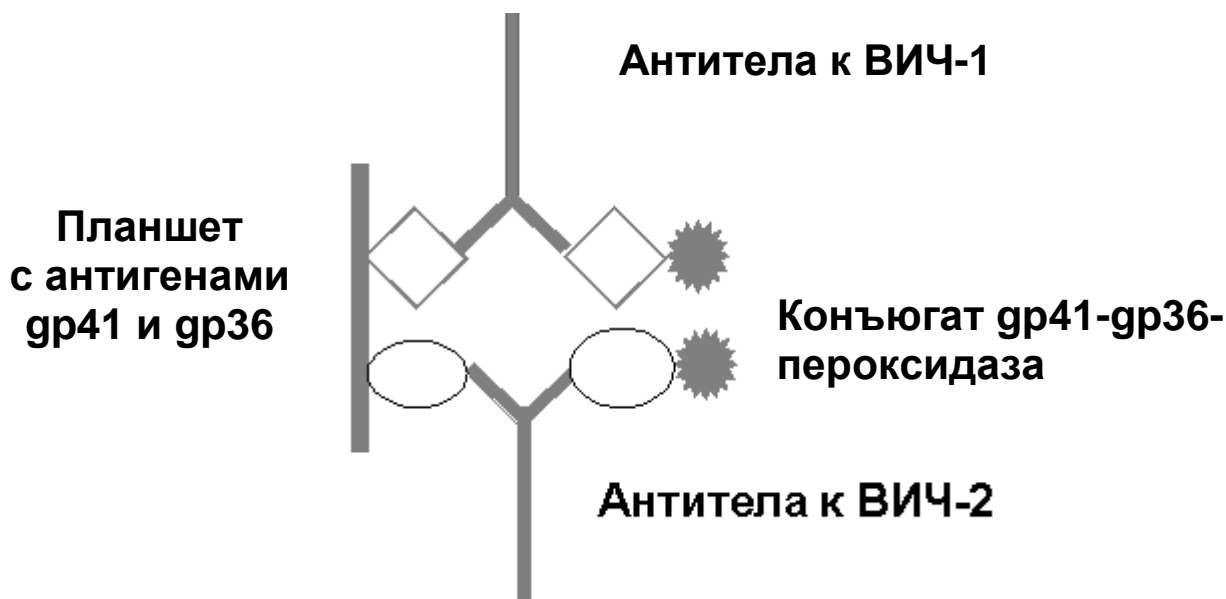


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству антител к ВИЧ-1,2 в анализируемых пробах. После измерения оптических плотностей растворов в лунках наличие антител к ВИЧ-1,2 оценивают относительно значения ОПкрит. Положительными считают образцы со значением оптической плотности равным или превышающим значение ОПкрит. Отрицательными считают образцы со значением оптической плотности меньшим, чем значение ОПкрит.

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок рекомбинантными антигенами ВИЧ-1,2, маркирован «Стрипы с рекомбинантными антигенами ВИЧ-1 и ВИЧ-2» – 1 упаковка или 2 упаковки в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- отрицательная контрольная проба (К), не содержащая антитела к ВИЧ-1,2. Флакон маркирован «Отрицательная контрольная проба» – 1 флакон или 2 флакона в зависимости от варианта комплектации (лиофилизированный препарат или жидкость, 0,8 мл) (Таблица 1);
- ВИЧ-1 положительная контрольная проба (K⁺_{ВИЧ-1}), содержащая антитела к ВИЧ-1. Флакон маркирован «ВИЧ-1 положительная контрольная проба» – 1 флакон или 2 флакона в зависимости от варианта комплектации (лиофилизированный препарат или жидкость, 0,5 мл) (Таблица 1);

- ВИЧ-2 положительная контрольная проба ($K^+_{\text{ВИЧ-2}}$), содержащая антитела к ВИЧ-2. Флакон маркирован «ВИЧ-2 положительная контрольная проба» – 1 флакон или 2 флакона в зависимости от варианта комплектации (лиофилизированный препарат или жидкость, 0,5 мл) (Таблица 1);
- конъюгат gr41-gr36-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон или 2 флакона в зависимости от варианта комплектации (лиофилизированный препарат или жидкость, 7 мл) (Таблица 1);
- водно-солевой раствор для разведения конъюгата, маркирован «Буфер Е» (при включении в набор лиофилизованного конъюгата) — 1 флакон или 2 флакона в зависимости от варианта комплектации (9 мл) (Таблица 1);
- аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» - 1 флакон или 2 флакона в зависимости от варианта комплектации (7 мл) (Таблица 1);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер V» — 2 флакона или 4 флакона в зависимости от варианта комплектации (14 мл) (Таблица 1);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон или 2 флакона в зависимости от варианта комплектации (14 мл) (Таблица 1);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон или 2 флакона в зависимости от варианта комплектации (14 мл) (Таблица 1);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена) – 1 штука или 2 штуки в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- одноразовые ванночки для реагентов – 2 штуки (Таблица 1);
- одноразовые наконечники для пипеток – 16 штук (Таблица 1).

Таблица 1. Варианты комплектации

Название компонента	96 определений (лиофилизированный конъюгат)	96 определений (жидкий конъюгат)	192 определения (лиофилизированный конъюгат)	192 определения (жидкий конъюгат)
Комплект стрипов в рамке	1 шт.	1 шт.	2 шт.	2 шт.
Отрицательная контрольная проба	1 фл.	1 фл.	2 фл.	2 фл.
ВИЧ-1 положительная контрольная проба	1 фл.	1 фл.	2 фл.	2 фл.
ВИЧ-2 положительная контрольная проба	1 фл.	1 фл.	2 фл.	2 фл.
Конъюгат Е	1 фл.	1 фл.	2 фл.	2 фл.
Буфер Е	1 фл.	-	2 фл.	-
Буфер А	1 фл.	1 фл.	2 фл.	2 фл.
Буфер V	2 фл.	2 фл.	4 фл.	4 фл.
Раствор ТМБ	1 фл.	1 фл.	2 фл.	2 фл.
Стоп-реагент	1 фл.	1 фл.	2 фл.	2 фл.
Пакет полиэтиленовый закрывающийся	1 шт.	1 шт.	2 шт.	2 шт.
Одноразовые ванночки для реагентов	2 шт.	2 шт.	2 шт.	2 шт.
Одноразовые наконечники для пипеток	16 шт.	16 шт.	16 шт.	16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность. Определяется как доля полученных отрицательных результатов в исследуемых образцах, не содержащих антитела к ВИЧ-1,2. Диагностическая специфичность набора «ВичИФА-анти-НIV-1,2» по ОСО 42-28-214-02П составляет 100%.

3.2. Диагностическая чувствительность. Определяется как доля полученных положительных результатов в исследуемых образцах, содержащих антитела к ВИЧ-1,2. Диагностическая чувствительность набора «ВичИФА-анти-НIV-1,2» по ОСО 42-28-212-02П и ОСО 42-28-216-02 составляет 100%.

3.3. Коэффициент вариации оптической плотности в одном и том же образце при определении антител к ВИЧ-1,2 с использованием набора «ВичИФА-анти-НIV-1,2» не превышает 8%.

3.4. 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 «ВичИФА-анти-НIV-1,2» хук-эффект не был обнаружен.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 3.

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.

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;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-1000 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.

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°C не более 2-х суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

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 контрольные пробы готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных контрольных проб перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. Во флакон с лиофилизированной отрицательной контрольной пробой внести 0,8 мл дистиллированной воды, во флаконы с лиофилизированными ВИЧ-1 положительной контрольной пробой и ВИЧ-2 положительной контрольной пробой внести по 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 Е готов к использованию.

7.1.4. Жидкий конъюгат Е готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 0,58 мл.

Для восстановления лиофилизованного конъюгата перед вскрытием флакона легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенке флакона или к крышке. Открыть флакон и положить крышку перевернутой на сухую поверхность.

Во флакон с лиофилизированным конъюгатом внести 1 мл дистиллированной воды и закрыть крышкой. Выдержать флакон в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флакон, перемешать его содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флакон при комнатной температуре, периодически перемешивая.

Весь объем содержимого флакона перенести во флакон с буфером Е. Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Расход конъюгата на один стрип составляет 0,83 мл.

7.1.5. Буфер А готов к использованию. Расход буфера А на один стрип составляет 0,58 мл.

7.1.6. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера V развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера V + 95 мл дистиллированной воды

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.7. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,16 мл.

7.1.8. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,16 мл.

7.1.9. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

На странице 22 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок.

ВНИМАНИЕ: схема маркировки и внесения образцов отличается от стандартной схемы.

Лунки промаркировать следующим образом:

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

A2, B1, B2 – №2 – для измерения величины оптической плотности К;

C1, C2 – №3 – для измерения величины оптической плотности $K_{\text{вич-1}}^+$;

D1, D2 – №4 – для измерения величины оптической плотности $K_{\text{вич-2}}^+$.

7.2.2. Во все лунки, кроме лунки A1, внести по 50 мкл буфера А.

7.2.3. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл контрольных проб, в оставшиеся лунки - по 50 мкл исследуемых образцов в дубликатах.

Примечание: общее время внесения контрольных проб и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации различных образцов будет значительно отличаться, что в конечном итоге может привести к получению неправильного диагноза.

7.2.4. Во все лунки, кроме лунки A1, внести по 50 мкл конъюгата.

7.2.5. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре **+37°C со скоростью 500-700 об/мин.**

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 8 раз. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.6, и **выдерживать в течение 30 сек.** 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. При автоматической промывке необходимо заполнять лунки полностью и следить за качеством аспирации

7.2.7. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 20 минут.

7.2.8. 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.

Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.8., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

При регистрации результатов **необходимо вычитать** величину оптической плотности в лунке A1 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Значение оптической плотности в лунке A1 не должно превышать 0,09 ед.опт.пл.

Примечание: Допускается настройка спектрофотометра «по воздуху».

8.2. Критерии достоверности анализа

Результаты анализа считают достоверными при соблюдении следующих условий:

- Значение ОП в каждой лунке с К⁻ должно быть менее 0,2* ед.опт.пл.;
- Средние значения ОП в лунках с К⁺_{вич-1} и К⁺_{вич-2} должны быть более 0,4 ед.опт.пл.

В случае если полученные данные выходят за пределы указанных значений, результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Определить значение ОП_{крит.}, для чего к среднему значению^{**} ОП К⁻ прибавить К_{крит.}

К_{крит.} – коэффициент, определяемый на предприятии-изготовителе, и указанный в аналитическом паспорте.

9.2. Сравнить среднее значение ОП каждого исследуемого образца со значением ОП_{крит.}

Если среднее значение ОП образца **меньше ОП_{крит.}**, то считают, что исследуемый образец не содержит антитела к ВИЧ-1,2.

Если среднее значение ОП образца немного меньше ОП_{крит.} (в пределах 10%), рекомендуется повторить учет результатов (см. Примечание ниже) и исследовать его повторно.

Если среднее значение ОП образца **больше или равно ОП_{крит.}**, то образец должен быть исследован повторно. **Только при получении аналогичных результатов считают, что образец содержит антитела к ВИЧ-1,2.**

Примечание: Для более точного расчета ОП_{крит.} необходимо определить допустимый диапазон разброса значений ОП К⁻, для чего среднее арифметическое значение ОП К⁻, рассчитанное согласно п.9.1., умножить на 0,6 и 1,4. Сравнить ОП в каждой лунке с расчетным диапазоном. Оптическая плотность каждой лунки, содержащей К⁻, должна попадать в полученный диапазон. Если значение ОП в одной из лунок не удовлетворяет этому критерию, то это значение можно исключить. **Исключить одно значение ОП можно только в том случае, если ранее ни одно из значений ОП исключено не было, в противном случае результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.** Затем рассчитать среднее арифметическое значение по ОП для двух оставшихся лунок, повторно определить допустимый диапазон разброса значений К⁻ и сравнить с ним ОП в каждой из двух оставшихся лунок. **Если ОП хотя бы одной из лунок не попадает в полученный диапазон, результаты анализа считают недостоверными и анализ повторяют.** Если значения ОП в обеих лунках удовлетворяют критерию, перейти к п. 9.1.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ВичИФА-анти-HIV-1,2» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°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

* Если настройка спектрофотометра осуществляется «по воздуху», значение в каждой лунке с К⁻ должно быть менее 0,29 ед.опт.пл.

** Для расчета среднего значения ОП К⁻ использовать только те значения, которые удовлетворяют критерию достоверности. В случае если два значения ОП из трех не удовлетворяют критерию, анализ следует повторить.

закрывать. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;

- жидкие, готовые к использованию, контрольные пробы после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов контрольные пробы хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- восстановленный (растворенный) из лиофилизованного препарата и разведенный в буфере Е конъюгат хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- жидкий конъюгат Е, буфер А и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток;
- буфер V и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

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

- для каждого независимого эксперимента необходимо определять оптические плотности контрольных проб и ОПкрит.;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, буфера А, 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 промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

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

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

10.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	50 мкл буфера А	КТ	Внесение контрольных проб и исследуемых образцов не более 15'	В лунку для определения ОП ТМБ ничего не вносить. К ⁺ внести в трипликате, К ⁺ ВИЧ-1 и К ⁺ ВИЧ-2 - в дубликатах.
2		50 мкл контрольных проб			
3		50 мкл исследуемых образцов			
4		50 мкл конъюгата Е			
5	Инкубация	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500-700 об/мин
6	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (8 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера V+266 мл H ₂ O
7	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
8	Инкубация с ТМБ	—	КТ	20'	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

Примечания: