



РОССИЯ г. Нижний Новгород
Почтовый адрес: 603093 ул. Яблоневая, 22, а/я 69
Юридический адрес: 603094 ул. Коминтерна, 47
ИНН 5259000159 КПП 525901001
ОГРН 1025202838627
E-mail: info@npods.nnov.ru
www.npods.ru

Приемная	тел./факс	(831)	434-97-70
Канцелярия	тел./факс	(831)	434-86-83
Бухгалтерия	тел./факс	(831)	434-97-74
Департамент продаж	тел./факс	(831)	467-82-02 467-82-15 467-82-16 467-82-17



ТН-351



96



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
"ДС-ИФА-Тироксид-ТТГ"
Тест-система иммуноферментная для количественного
определения тиреотропного гормона

1. Назначение

1.1 Набор реагентов "ДС-ИФА-Тироксид-ТТГ" предназначен для количественного определения тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2 ТТГ – гликопротеиновый гормон, секретируемый передней долей гипофиза, который стимулирует синтез трийодтиронина и тироксина в щитовидной железе. Количественное определение уровня ТТГ необходимо для диагностики нарушений функции щитовидной железы и контроля за ходом лечения.

1.3 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных проб, одна проба контрольной сыворотки, шесть стандартных калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора при одновременном использовании всех стрипов планшета (всего 96 определений).

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование всех стандартных калибровочных проб.

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

В наборе «ДС-ИФА-Тироксид-ТТГ» применен «сэндвич»-вариант твердофазного ИФА. Для реализации его использованы два моноклональных антитела с разной специфичностью к двум доменам молекулы ТТГ: первые антитела иммобилизованы на твердой фазе, вторые (меченные пероксидазой хрена) входят в состав конъюгата. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-ТТГ-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация ТТГ, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ТТГ в исследуемом образце.

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

2.2 Состав набора реагентов «ДС-ИФА-Тироксид-ТТГ»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент – планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к тиреотропному гормону.	1 шт
Конъюгат – моноклональные антитела к ТТГ человека, меченные пероксидазой хрена. Прозрачная или опалесцирующая розового цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат.	1 флакон 6,0 мл
Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4, Калибратор 5 – стандартные калибровочные пробы, аттестованные по Третьему Международному стандарту ВОЗ IRP 81/565 (принятому взамен 2 IRP 80/558), содержащие известные количества тиреотропного гормона. Прозрачные или слегка опалесцирующие светло-желтого цвета жидкости. Значения концентраций ТТГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержат: 0,1% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат, 0,1% фенол.	6 флаконов по 0,5 мл (Калибратор 0 – 2,0 мл)
Контрольная сыворотка – сыворотка с известным содержанием ТТГ. Прозрачная или слегка опалесцирующая светло-желтого цвета жидкость. Значение концентрации ТТГ в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат, 0,1% фенол.	1 флакон 0,5 мл
ПР (концентрат х 25) – промывочный раствор, концентрат. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор – прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 14,0 мл
Стоп-реагент/0,2М – серная кислота в концентрации 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл
Бланк для построения калибровочной кривой	1 шт
Инструкция по применению	1 шт

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- калибратор с повышенным содержанием ТТГ;
- крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов;
- одноразовые наконечники;
- пластиковые ванночки для жидких реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или полиэтиленовый пакет с замком.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ТТГ в сыворотке крови человека составляет 0,05 мкМЕ/мл.

3.2 Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции компонентов системы с хорионическим гонадотропином, лютеинизирующим и фолликулостимулирующим гормонами.

3.3 Коэффициент вариации результатов определения ТТГ в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8%.

3.4 Линейность. Зависимость концентрации ТТГ имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №1 – №5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.5 Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ТТГ – соответствие измеренной концентрации ТТГ предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов калибровочной пробы №2 и контрольной сыворотки. Процент открытия составляет от 90 до 110%.

3.6 Клиническая проверка. Концентрацию ТТГ измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 178 здоровых людей в возрасте от 21 до 50 лет. Средняя концентрация ТТГ составила 1,9 мкМЕ/мл (от 0,4 до 4,0 мкМЕ/мл).

Таблица 2

Возраст	Нормальный уровень
< 2,5 мес	От 0,6 до 10 мкМЕ/мл
2,5 мес – 2 года	От 0,4 до 7 мкМЕ/мл
2 – 5 лет	От 0,4 до 6 мкМЕ/мл
5 – 14 лет	От 0,4 до 5 мкМЕ/мл
> 14 лет	От 0,4 до 4 мкМЕ/мл

3.7 Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ТТГ, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

4. Меры предосторожности

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой от 18 до 24 °С.
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:
 - неспецифических компонентов (ПР (концентрат х 25), ТМБ-Субстратный раствор, Стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах для исследования гормонов и онкомаркеров, производства ООО «НПО «Диагностические системы».
- Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.
- Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстрата.
- Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.
- Промывка лунок – важный этап проведения анализа: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются раствором. Не следует допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.
- Нельзя использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.

- Необходимо использовать только валидированные дозаторы и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

5. Инструкция по безопасности

- Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.
- Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении Калибраторов и Контрольной сыворотки, были протестированы и определены нереактивными в отношении антигена вируса гепатита В (HBsAg), антител к вирусу гепатита С, антител к ВИЧ-1,2, антигена р24 ВИЧ-1 и к возбудителю сифилиса.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами и реагентами, необходимо обращаться как с инфекционными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезинфицировать поверхность 3% раствором хлорамина Б.
- Необходимо избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, Стоп-реагента с кожей и слизистыми.
- После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кг/см² (0,15 МПа). Допустимо обеззараживание твердых отходов способом погружения в 3% раствор хлорамина Б (длительность дезинфекции не менее 1 часа) или другого разрешенного к промышленному выпуску и применению в РФ дезинфицирующего средства. Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кг/см² (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.
-  xi Некоторые реагенты содержат 0,1% проклин 300. Проклин 300 0,1% – раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- Термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$;
- Устройство для промывания планшетов (вошер);
- Дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5-50 мкл; на 40-200 мкл; на 200-1000 мкл; на 1000-5000 мкл с наконечниками;
- Дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- Цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);
- стакан стеклянный (500 мл);
- Вода дистиллированная;
- Бумага фильтровальная лабораторная;
- Перчатки резиновые или пластиковые.

7. Анализируемые образцы сывороток крови человека

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. **Недопустимо использование образцов с добавлением азидата натрия в качестве консерванта!** Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником. Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

8. Подготовка реагентов для анализа

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре.

8.1 Иммуносорбент. Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре в закрытом пакете не менее 30 минут!

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.

Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать с помощью скрепки для фольгированного пакета (не удаляя осушитель!). Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета. Или поместить вскрытый фольгированный пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком.

8.2 ПР – рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом ПР тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной (например, к 10 мл концентрата ПР добавить 240 мл воды). Полученный раствор тщательно перемешать.

8.3 Конъюгат – готов к применению.

8.4 Стандартные калибровочные пробы – готовы к применению.

8.5 Контрольная сыворотка – готова к применению.

8.6 ТМБ-Субстратный раствор – готов к применению.

8.7 Стоп-реагент – готов к применению.

9. Проведение анализа

9.1 Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 50 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки внести по 50 мкл исследуемых образцов сывороток крови в двух повторах. **Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!**

9.2 Во все лунки, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести дозатором по 50 мкл конъюгата, планшет покрыть крышкой или защитной пленкой.

9.3 Возможны две процедуры инкубации планшета:

Процедура 1 (термостатируемый шейкер, $(37,0 \pm 0,5)$ °C):

Планшет выдержать 45 мин на термостатируемом шейкере со скоростью от 500 до 800 об/мин и при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °C.

Процедура 2 (комнатная температура):

После внесения в лунки планшета образцов и конъюгата содержимое перемешать аккуратным постукиванием по краям планшета в течение 30 секунд, стрипы закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать в течение 120 минут при комнатной температуре (здесь 20-25 °C).

9.4 По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в емкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 5 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в емкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

9.5 Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и выдержать при комнатной температуре в темноте:

Процедура 1: 25-30 мин;

Процедура 2: 15-20 мин.

9.6 Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл Стоп-реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5-10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении 2.

9.7 Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы «ДС-ИФА-Тирод-ТТГ» на автоматических ИФА-анализаторах.

Контроль внесения конъюгата рекомендуется проводить при длинах волн 540 (550) нм, критерий: ОП > 0,500.

10. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны 450 нм с настройкой прибора по «воздуху».

11. Учет результатов

Реакцию следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках с контролем ТМБ-Субстратного раствора – не более 0,1.

Необходимо построить калибровочный график по средним величинам ОП «Калибратора 0»; «Калибратора 1»; «Калибратора 2»; «Калибратора 3»; «Калибратора 4»; «Калибратора 5». На бланке для построения калибровочной кривой по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации ТТГ, выраженной в мкМЕ/мл, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

Для образца с ОП выше, чем в калибровочной пробе №5, выдается результат: больше номинации «Калибратора 5» или этот образец должен быть протестирован в разведении 1:20 (на «Калибраторе 0») – 190 мкл «Калибратора 0» + 10 мкл исследуемого образца. В случае разведения образца необходимо измеренную концентрацию ТТГ умножить на фактор разведения.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций ТТГ в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации ТТГ в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

12. Калибратор с повышенным содержанием ТТГ

В случае использования калибратора с повышенным содержанием ТТГ регистрацию результатов необходимо проводить спектрофотометрически при длине волны 405-415 нм.

Необходимо построить калибровочный график по средним величинам ОП «Калибратора 5» и «Калибратора с повышенным содержанием ТТГ». На бланке для построения калибровочной кривой по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации ТТГ, выраженной в мкМЕ/мл, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

13. Ограничения теста

13.1 Все реагенты набора предназначены для определения тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови человека. Набор не предназначен для определения тиреотропного гормона (ТТГ) в слюне, плазме и других образцах человеческого или животного происхождения.

13.2 Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры теста могут повлиять на результаты.

13.3 Для разведения образцов сывороток с высоким содержанием тиреотропного гормона следует использовать «Калибратор 0». Применение других реагентов может привести к ложным результатам.

13.4 Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результате данного теста. Любой лабораторный результат является только частью общей клинической картины пациента.

13.5 При применении пропранола, метимазола, дофамина и д-тироксина наблюдалось снижение значения тиреотропного гормона.

13.6 Результаты образцов взятых у пациентов получивших препарат антител мыши в диагностических целях или для лечения должны интерпретироваться с осторожностью, т.к. гетерофильные антитела к белкам мыши или другим животным белкам могут повлиять на данный анализ.

13.7 Ноок-эффект в данном тесте не наблюдался.

13.8 Набор не предназначен для тестирования образцов сывороток крови новорожденных.

14. Условия хранения и эксплуатации набора

14.1 Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности. Срок годности указан на упаковке набора.

14.2 Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.

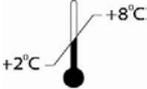
14.3 В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- Иммуносорбент – пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.
- ПР (концентрат х 25) – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат х 25) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С;
- Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут при комнатной температуре или 28 сут при температуре от 2 до 8 °С.
- Конъюгат – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.
- Стандартные калибровочные пробы – после вскрытия флакона оставшиеся неиспользованными калибровочные пробы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.
- Контрольная сыворотка – после вскрытия флаконов оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.
- ТМБ-Субстратный раствор – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.
- Стоп-реагент – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным Стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

14.4 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя – ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

15. Объяснение символов

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Производитель
	Каталожный номер
	Количество определений
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности число/месяц/год
	Использовать инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

16. Список литературы

1. Fisher D.A., "Physiological variation in thyroid hormones. Physiological and pathophysiological considerations". Clinical Chemistry, 42, 135-139 (1996).
2. Spencer C.A., et al., "Interlaboratory/Intermethod differences in functional sensitivity of immunometric assay of Thyrotropin (TSH) and impact on reliability of measurement of subnormal concentration of TSH". Clinical Chemistry, 41, 367 (1995).

Методы математической обработки результатов

При учете результатов с помощью встроенного или внешнего программного обеспечения спектрофотометра рекомендуется использовать следующие методы математической обработки результатов:

Марка спектрофотометра	Рекомендуемые методы математической обработки
Statfax 2100, 3200	Point-to-point
Tecan Sunrise	Point-to-point
Bio-Rad 680	4 PL-Cook-Wilkenson Point-to-point
Multiscan EX	Point-to-point

СХЕМА АНАЛИЗА

1	Внести	По 50 мкл калибраторов и контрольной сыворотки в двух повторах; По 50 мкл исследуемых сывороток в двух повторах	
2	Внести	По 50 мкл конъюгата во все лунки, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора	
3	Инкубировать	Процедура 1 45 мин, шейкер, 37 °С	Процедура 2 120 мин, комнатная температура
4	Промыть планшет	5 раз, не менее 300 мкл рабочего промывочного раствора	
5	Внести	По 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора во все лунки	
6	Инкубировать	Процедура 1 25-30 мин, в темноте	Процедура 2 15-20 мин, в темноте
7	Внести	По 150 мкл Стоп-реагента	
8	Встряхнуть	В течение 5-10 секунд	
9	Учет результатов	450 нм	

