



РОССИЯ г. Нижний Новгород	Приемная	тел./факс	(831) 434-97-70
Почтовый адрес: 603093 ул. Яблоневая, 22, а/я 69	Канцелярия	тел./факс	(831) 434-86-83
Юридический адрес: 603094 ул. Коминтерна, 47	Бухгалтерия	тел./факс	(831) 434-97-74
ИНН 5259000159 КПП 525901001	Департамент продаж	тел./факс	(831) 467-82-02
ОГРН 1025202838627			467-82-15
E-mail: info@npods.nnov.ru			467-82-16
www.npods.ru			467-82-17

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«ДС-ИФА-Тироид-анти-ТПО»

Тест-система иммуноферментная для количественного определения аутоантител к тироидной пероксидазе

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС-ИФА-Тироид-анти-ТПО» предназначен для количественного определения уровня аутоантител к тироидной пероксидазе (ТПО) в сыворотке крови человека при помощи иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Аутоантитела к ТПО относятся в основном к классу IgG. В сыворотке здоровых людей антитела к ТПО могут содержаться в концентрации до 30 МЕ/мл. Концентрации анти-ТПО выше этого уровня расцениваются как показатель аутоиммунного процесса. Определение анти-ТПО может быть использовано для диагностики аутоиммунных поражений щитовидной железы (диффузный токсический зоб, аутоиммунный тиреоидит).

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах в 48 пробах (41 неизвестная проба, одна проба контрольной сыворотки, пять стандартных калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора) при одновременном использовании всех стрипов планшета.

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

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия.

На первой стадии анализа анти-ТПО, содержащиеся в калибровочных и исследуемых пробах, связываются с тироидной пероксидазой, иммобилизованной на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа связавшиеся анти-ТПО взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству анти-ТПО в исследуемом образце.

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

2.2. Состав набора реагентов «ДС-ИФА-Тироид-анти-ТПО»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки), в лунках которого сорбирован нативный антиген тироидной пероксидазы (ТПО) щитовидной железы человека.	1 шт.
Конъюгат - антитела против иммуноглобулина G человека, меченные пероксидазой хрена. Прозрачная или опалесцирующая желтого цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,004% гентамицина сульфат, 0,05% проклин 300.	1 флакон 12,0 мл
Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4 – стандартные калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, аттестованные по Первому международному стандарту IRP 66/387, содержащие известные количества анти-ТПО. Прозрачные или опалесцирующие бесцветные или светло-желтого цвета жидкости. Значения концентраций анти-ТПО в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержат: 0,1% азид натрия, 0,1% фенол.	5 флаконов по 1,0 мл
Контрольная сыворотка - сыворотка с известным содержанием анти-ТПО. Прозрачная или опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость. Значение концентрации анти-ТПО в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержит: 0,1% азид натрия, 0,1% фенол.	1 флакон 1,0 мл
PPC - раствор для предварительного разведения сывороток. Прозрачная или слегка опалесцирующая сине-фиолетового цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,1% азид натрия, 0,1% фенол.	1 флакон 12,0 мл
БР - блок-раствор для рабочего разведения сывороток. Прозрачная или слегка опалесцирующая розового цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,1% азид натрия, 0,1% фенол.	1 флакон 12,0 мл
ПР (концентрат x 25) – промывочный раствор, концентрат. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор - прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 12,0 мл
Стоп-реагент/0,2М - серная кислота в концентрации 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 15,0 мл
Планшет для предварительного разведения сывороток	1 шт.
Бланк для построения калибровочной кривой	1 шт.
Инструкция по применению	1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- 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 анти-ТПО в сыворотке крови человека не превышает 2 МЕ/мл.

3.2. Коэффициент вариации результатов определения анти-ТПО в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «ДС-ИФА-Тироид-анти-ТПО» не превышает 8%.

3.3. Специфичность. Использование высокоочищенной ТПО для сенсibilизации стрипов обеспечивает высокую специфичность анализа.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации анти-ТПО имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №1–№4. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

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

3.6. Клиническая проверка. Содержание анти-ТПО измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 350 здоровых людей в возрасте от 21 до 45 лет. Измеренная концентрация анти-ТПО не превышала 30 МЕ/мл в 99,2% случаев.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций анти-ТПО, соответствующие нормальным.

4. Меры предосторожности

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

4.1. Постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой от 18 до 24 °С.

4.2. 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».

4.3. Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.

4.4. Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.

4.5. Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгатов.

4.6. Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.

4.7. Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстрата.

4.8. Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.

4.9. 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.

4.10. Нельзя использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.

4.11. Необходимо использовать только валидированные дозаторы и оборудование.

4.12. Нельзя изменять процедуру проведения анализа.

4.13. Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

5. Инструкция по безопасности

5.1. Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.

5.2. Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении Калибраторов и Контрольной сыворотки, не содержат антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ-1,2, антиген вируса гепатита В (HBsAg), p24 ВИЧ-1 и антитела к возбудителю сифилиса.

5.3. В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.

5.4. Нельзя пипетировать ртом.

5.5. 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.

5.6. При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами и реагентами, необходимо обращаться как с инфекционными материалами.

5.7. При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.

5.8. Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезактивировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.

5.9. Необходимо избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, стоп-реагента с кожей и слизистыми.

5.10. После проведения ферментной 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 погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезактивации – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дезактивирующего средства. Твёрдые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/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.



5.11. ^{xi} Некоторые реагенты содержат 0,05% проклин 300. Проклин 300 0,05% - 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;
- шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин;
- термостат для инкубации при температуре $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$;
- 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. 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 промывочного раствора 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. РРС - готов к применению.

8.4. БР - готов к применению.

8.5. Конъюгат – готов к применению.

8.6. Стандартные калибровочные пробы - готовы к применению.

8.7. Контрольная сыворотка - готова к применению.

8.8. ТМБ-Субстратный раствор – готов к применению.

8.9. Стоп-реагент - готов к применению.

9. Проведение анализа

9.1. Перед проведением ИФА необходимо вставить в рамку нужное количество стрипов.

9.2. Исследуемые сыворотки развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РРС). Для этого внести в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл раствора, добавить по 10 мкл сыворотки и тщательно перемешать. При этом фиолетово-синий цвет меняется на зеленовато-голубой. Разведенные сыворотки не хранить!

9.3. Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 100 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки иммуносорбента внести по 90 мкл БР, затем по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (конечное разведение сывороток 1:100). Исследуемые образцы тестировать в дубликатах. Содержимое лунок тщательно перемешать пипетированием. **Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!** Планшет закрыть крышкой или защитной пленкой.

9.4. Возможны две процедуры инкубации планшета:

Процедура 1 (термостат, $(37,0 \pm 1,0)$ °C):

Планшет выдержать 30 минут в термостате при температуре $(37,0 \pm 1,0)$ °C.

Процедура 2 (комнатная температура):

Планшет выдержать 60 минут при комнатной температуре (здесь 20-25 °C).

9.5. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 3 раза рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость 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.

9.6. Во все лунки стрипов, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 100 мкл конъюгата, планшет покрыть крышкой или защитной пленкой.

9.7. Возможны две процедуры инкубации планшета:

Процедура 1 (термостат, $(37,0 \pm 1,0)$ °C):

Планшет выдержать 30 минут в термостате при температуре $(37,0 \pm 1,0)$ °C.

Процедура 2 (комнатная температура):

Планшет выдержать 60 минут при комнатной температуре (здесь 20-25 °C).

9.8. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 5 раз, как в п. 9.5.

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

Процедура 1: 20-30 мин.

Процедура 2: 10-15 мин.

9.10. Реакцию остановить добавлением в лунки по 150 мкл стоп-реагента, встряхивать 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.

10. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

11. Учет результатов

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

По результатам измерений вычислить средние арифметические значения ОП для дубликатов калибровочных образцов. На бланке для калибровочных проб в линейных координатах построить калибровочную кривую: ось абсцисс X – концентрации антител к ТПО в калибровочных пробах (МЕ/мл), ось ординат Y - значения средней ОП калибровочных проб. По калибровочному графику определить концентрацию анти-ТПО в исследуемых сыворотках. Для образца с ОП выше, чем в калибровочной пробе №4, выдается результат: больше номинации «Калибратора 4» или этот образец должен быть протестирован в большем разведении (на БР). В случае дополнительного разведения образца необходимо измеренную концентрацию антител к ТПО умножить на фактор разведения.

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

12. Ограничения теста

12.1. При использовании двух и более планшетов, рекомендуется ставить калибровочные пробы при каждой постановке.

12.2. Нельзя касаться дна лунок.

12.3. Результат тестирования на анти-ТПО считается позитивным, если концентрация анти-ТПО превышает 30 МЕ/мл. Результаты тестирования на антитела к ТПО и тиреоглобулину используются для оценки состояния щитовидной железы. Однако постановка диагноза не может быть основана только на результате данного теста, который должен рассматриваться совместно с клинической картиной и результатами других тестов.

12.4. Около 10% здоровых людей могут иметь антитела к ТПО. Количество таких лиц может зависеть от возраста, пола и географического региона.

13. Условия хранения и эксплуатации набора

13.1. 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 набора – 13 месяцев.

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

13.3. 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.

- РРС - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным РРС хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

- БР - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным БР хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора 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 флакона оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

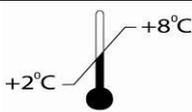
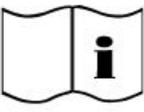
- ТМБ-Субстратный раствор – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- 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.

13.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата 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.

14. Объяснение символов

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Смотрите инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

15. Список литературы

1. Volpe R., "Autoimmune disease of the endocrine system", Boca Raton FL, CRC Press (1990).
2. Volpe R., Clin Chem, Vol. 40, 2132 (1994).
3. Degroot LJ, "Heterogeneity of human antibodies to TPO Thyroperoxidase", Thyroid Autoimmunity, 207, 177-182 (1990).

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	4 parameters
Bio-Rad 680	Point-to-point
Multiscan EX	Point-to-point

СХЕМА АНАЛИЗА

1	Внести	По 90 мкл РРС и 10 мкл исследуемых образцов (проводить в планшете для предварительного разведения)	
2	Внести	По 100 мкл калибраторов и контрольной сыворотки в двух повторах; По 90 мкл БР и по 10 мкл исследуемых сывороток, предварительно разведенных РРС (см. п. 1), в двух повторах	
3	Инкубировать	Процедура 1 30 мин, термостат, 37 °С	Процедура 2 60 мин, комнатная температура
4	Промыть планшет	3 раза, не менее 300 мкл рабочего промывочного раствора	
5	Внести	По 100 мкл конъюгата во все лунки, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора	
6	Инкубировать	Процедура 1 30 мин, термостат, 37 °С	Процедура 2 60 мин, комнатная температура
7	Промыть планшет	5 раз, не менее 300 мкл рабочего промывочного раствора	
8	Внести	По 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора во все лунки	
9	Инкубировать	Процедура 1 20-30 мин, в темноте	Процедура 2 10-15 мин, в темноте
10	Внести	По 150 мкл стоп-реагента	
11	Встряхнуть	в течение 5-10 секунд	
12	Учет результатов	450 нм	

