

УТВЕРЖДАЮ

**Заместитель генерального директора
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические системы»**

О.Н. Шлюндин

2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ по применению набора реагентов «ДС-ИФА-Тироксид-Т4свободный»

**Тест-система иммуноферментная для количественного определения
свободного тироксина**

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС-ИФА-Тироксид-Т4свободный» предназначен для количественного определения концентрации свободного тироксина (Т4 св) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Тироксин — тироидный гормон с молекулярным весом 777 Да, является одним из гормонов, синтезируемых щитовидной железой. Т4 циркулирует в крови в свободной и связанной (с тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), тироксинсвязывающим преальбумином и альбумином) формах. Гормональной активностью обладает только свободный Т4, хотя его доля очень мала — 0,03% от общего содержания Т4. Количественное определение концентрации свободного Т4 в крови является важным показателем при диагностике заболеваний щитовидной железы.

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 при каждой постановке.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия.

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. При добавлении исследуемого образца и конъюгата Т4-пероксидаза во время инкубации эндогенный Т4 сыворотки крови конкурирует с Т4, входящим в состав конъюгата, за связывание с моноклональными антителами к Т4, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами конъюгата Т4-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству свободного Т4 в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата Т4-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация свободного Т4 в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора реагентов «ДС-ИФА-Тиронд-Т4 свободный»

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 тироксину.	1 шт.
Конъюгат - тироксин (Т4), меченный пероксидазой хрена. Прозрачная розового цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат.	1 флакон 12,0 мл
Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4, Калибратор 5 – стандартные калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества свободного Т4. Прозрачные или слегка опалесцирующие светло-желтого цвета жидкости. Значения концентраций свободного тироксина в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества. В качестве консерванта содержат 0,1% проклин 300, 0,1% фенол.	6 флаконов по 0,5 мл
Контрольная сыворотка - сыворотка с известным содержанием свободного Т4. Прозрачная или слегка опалесцирующая светло-желтого цвета жидкость. Значение концентрации тироксина в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества. В качестве консерванта содержит 0,1% проклин 300, 0,1% фенол.	1 флакон 0,5 мл
ПР (концентрат х 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 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:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетами 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 свободного Т4 в сыворотке крови человека составляет 1,0 пмоль/л.

3.2. Специфичность. Перекрестная реакция антител к тироксину с другими тироидами представлена в таблице 2.

Таблица 2

Кросс-реагент	Кросс-реактивность, %
L-тироксин	100
трийодтиронин	0,004
тетрайодтироацетат	0,001
дийодтиронин	0,002

3.3. Коэффициент вариации результатов определения свободного Т4 в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8%.

3.4. Клиническая проверка. Концентрацию свободного Т4 измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 216 здоровых людей в возрасте от 21 до 50 лет. Средняя концентрация Т4 свободного составила 15,6 пмоль/л (от 9,0 до 22,2 пмоль/л). При беременности значения Т4 свободного могут быть отличными от нормальных.

Правила пересчета результатов:

$$\text{пмоль/л} \times 0,777 = \text{пг/мл}; \text{пг/мл} \times 1,287 = \text{пмоль/л}.$$

3.5. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций свободного Т4, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

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 конъюгата.

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 конъюгата 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), р24 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 дезинфицировать поверхность 3% раствором хлорамина Б.

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

5.10. После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавируют растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в сточную трубу. 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.



5.11. **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 ± 0,5) °С;
- 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 термоинаktivированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. **Недопустимо использование образцов с добавлением азида натрия, тимеросала или фенола 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. Перед использованием отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

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 25 мкл в двух повторях. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки в двух повторях внести по 25 мкл исследуемых образцов сывороток крови. **Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!**

9.2. Во все лунки планшета, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 100 мкл конъюгата.

9.3. Возможны две процедуры инкубации планшета:

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

Планшет инкубировать в течение 30 минут на термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин и температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С.

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 60 минут при комнатной температуре (здесь 20-25 °С).

9.4. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость 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 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.

9.5. 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: 20-30 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-Тиронд-Т4свободный» 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 превышает 0,2.

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 свободного Т4, выраженной в пмоль/л, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб. По полученным точкам строят плавную калибровочную кривую.

Для обсчета результатов также возможно использовать построенный в системе координат "Logit-Log" график зависимости Logit (B/B_0) от логарифма (LN) концентрации свободного тироксина в калибровочных пробах, где B – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы, B_0 – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу 0. Logit (B/B_0) рассчитывается как $LN((1-B/B_0)/(B/B_0))$.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций свободного Т4 в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации свободного Т4 в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

12. Ограничения теста

12.1. Все реагенты набора предназначены для определения свободного тироксина в сыворотке крови человека. Набор не предназначен для определения тироксина в слюне, плазме и других образцах человеческого или животного происхождения.

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

12.3. Нельзя касаться дна лунок.

12.4. Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах данного теста. Например, наличие гетерофильных антител у пациентов, соприкасающихся с животными, может оказывать влияние на результаты иммунологических тестов. В диагностических целях результаты должны обязательно использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тестами.

12.5. Разнообразные лекарства, которые могут повлиять на связывание Т4 с белками-носителями тиреоидных гормонов или на их метаболизм, затрудняют интерпретацию

результатов тестирования на Т4 свободный. Случаи серьезных нетироидных заболеваний (НТЗ) также могут вызывать сложности в оценке результатов определения свободного Т4. В этих случаях может быть рекомендовано исследование на ТТГ с использованием набора «ДС-ИФА-Тироид-ТТГ» (кат № ТН-351), изготовленного в ООО «НПО «Диагностические системы».

12.6. В редких случаях, таких как наследственная альбумин-недостаточная гипертироксинемия, прямое исследование Т4 может давать неверные результаты.

12.7. Циркулирующие антитела к Т4 могут влиять на результаты теста.

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 указан на упаковке набора.

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.

- Конъюгат - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 °С 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.

13.4. 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.

14. 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 дата/месяц/год
	Смотрите инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

Директор по производству
ООО «Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»



В.К. Пименов

СОГЛАСОВАНО

Зав.кафедрой клинической лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России
д.м.н, профессор



В.В. Долгов

15. Список литературы

1. Sterling L., "Diagnosis and treatment of Thyroid Disease", CRC Press, 19-51 (1975).
2. Nelson J.C. and Wilcox, RB. "Analytical performance of Free and Total thyroxine assay". Clin. Chem. Vol. 42, 146-154 (1996).
3. Midgeley J. "Direct and Indirect Free Thyroxine Assay Methods in Theory and Practice", Clin. Chem, Vol.47, 1353-1363 (2001).
4. Gong Y., Hoffman B.R. "Free thyroxine reference interval in each trimester of pregnancy determined with the Roche Modular E-170 electrochemiluminescent immunoassay", Clin. Biochem, Vol. 41(10-11): 902-6 (2008).
5. Lee R.H., Spencer C.A., Mestman J.H. «Free T4 immunoassays are flawed during pregnancy», Am J Obstet Gynecol. 200(3):260.e1-6 (2009).
6. Stricker R., Echenard M., Eberhart R., Maud R. «Evaluation of maternal thyroid function during pregnancy: the importance of using gestational age-specific reference intervals», European Journal of Endocrinology, Vol 157: 509-514 (2007).

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	Linear regression в координатах Logit-Log
Tecan Sunrise	4 parameter Marquardt
Bio-Rad 680	4 PL-Cook-Wilkenson
Multiscan EX	Не рекомендуется автоматический расчет концентраций на ридере

СХЕМА АНАЛИЗА

1	Внести	По 25 мкл калибраторов и контрольной сыворотки в двух повторях; По 25 мкл исследуемых сывороток в двух повторях	
2	Внести	По 100 мкл конъюгата во все лунки, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора	
3	Инкубировать	Процедура 1 30 мин, шейкер, 37 °С	Процедура 2 60 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	20-30 мин, в темноте	
7	Внести	По 150 мкл стоп-реагента	
8	Встряхнуть	в течение 5-10 секунд	
9	Учет результатов	450 нм	

$$\text{пмоль/л} \times 0,777 = \text{пг/мл}$$

$$\text{пг/мл} \times 1,287 = \text{пмоль/л}$$

