

کیت غربالگری آنتی بادیهای IgG ضد هسته ای ANA به روش الایزا

حیطه کاربرد:

کیت الایزای غربالگری ANA پیشداز طب، برای سنجش کیفی حضور آنتی بادیهای IgG علیه آنتی ژنهای هسته ای در سرم یا پلاسمای انسان طراحی شده است. کیت الایزای ANA حضور آنتی بادی های IgG علیه ۹ آنتی ژن هسته ای و سیتوپلاسمی را به صورت همزمان در سرم یا پلاسمای افراد شناسایی می کند. این آنتی ژن ها شامل SSA/Ro، SSB/La، sm، smRNP، RNP، centromere B، Jo1، scl70 و dsDNA می باشند. از این کیت به عنوان یک ابزار کمک تشخیصی در بیماریهای روماتولوژیک خود ایمن سیستمیک معینی استفاده می گردد. محتوای این کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می باشد.

مقدمه:

اندازه گیری اتوآنتی بادیهای ضد آنتی ژنهای درون سلولی که آنتی بادیهای ضد هسته ای (ANA) نامیده می شود در تشخیص بیماریهای روماتولوژیک خود ایمن سیستمیک (SARDs) مانند سیستمیک لوپوس اریتماتوس (SLE)، سندرم شوگرن، بیماریهای بافت همبند مختلط (MCTD)، اسکروزیس سیستمیک (SSc) و میوپاتی های التهابی ایدیوپاتیک دارای اهمیت می باشد علاوه بر این، در حالیکه فراوانی ANA در بیماران مبتلا به SARD بیشتر است، این آنتی بادی ها در بیماران مبتلا به بیماری های خود ایمنی مختص ارگان (بیماری های خودایمن کبدی و تیروئیدیت هاشیموتو)، عفونت های خاص، سرطان، سن بالا و در برخی افراد سالم یافت می شود ارتباط معینی بین حضور اتوآنتی بادی ها و برخی بیماری های خودایمن مشاهده می شود از مهمترین این ارتباط ها می توان به حضور آنتی بادیهای ضد dsDNA و ضد Sm با SLE اشاره کرد. همچنین ارتباط بین آنتی بادی ضد Scl-70 با SSc پیشرونده، آنتی بادیهای ضد سانترومر با فرم جلدی محدود SSc و آنتی بادیهای ضد Jo-1 با میوزیت رامی توان برشمرد. برخلاف اختصاصیت برخی از ANA ها با بیماری خاص، آنتی بادیهای ضد SSA/Ro و SSB/La، علیرغم اینکه یکی از ویژگی های مهم سندرم شوگرن است، معمولاً در SLE و آرتریت روماتوئید نیز دیده می شوند. آنتی بادی های ضد RNP به تنهایی در MCTD یافت می شوند، در حالی که آنتی بادیهای ضد RNP همراه با سایر اتوآنتی بادیها، ممکن است در SSc پیشرونده، سندرم شوگرن و آرتریت روماتوئید مشاهده شود. ANA-IFA (ANA به روش ایمونوفلورسنت) با استفاده از سلولهای HEP-2 علیرغم داشتن نقاط ضعف و قوت، روش استاندارد طلایی برای تشخیص ANA در نظر گرفته شده است. این تست با حساسیت بالاتر به دلیل استفاده از تعداد بیشتر آنتی ژنها در فرم طبیعی آنها، با تغییرپذیری و عدم تکرار پذیری در آزمایشگاه های مختلف مواجه است. اما استفاده از روش الایزا راحت تر بوده و می تواند به راحتی به صورت دستگاهی انجام شود. علاوه بر این، سنجش ANA به روش الایزا حساسیت معادل و ویژگی بالاتری را در مقایسه با ANA-IFA ارائه می دهد. در ساخت کیت ANA Screen IgG پیشداز طب از آنتی ژن های هسته ای استخراج شده سلول HEP-2 در ترکیب با dsDNA و مخلوطی از پروتئین های خالص نوترکیب یا طبیعی شامل SSA/Ro، SSB/La، sm، smRNP، RNP، centromere B، scl70 و Jo1 استفاده می شود. از این رو کیت الایزای ANA Screen IgG پیشداز طب برای تشخیص کیفی آنتی بادیهای ضد هسته ای از کلاس IgG طراحی شده است که می تواند به عنوان کمکی برای تشخیص برخی از بیماریهای روماتولوژیک خود ایمن سیستمیک استفاده شود.

اساس آزمایش:

اساس آزمایش در این کیت روش الایزای غیر مستقیم (indirect) می باشد. در این کیت چاهکهای پلیت توسط مقادیر مشخصی از انواع آنتی ژنهای هسته ای پوشانده شده اند (coating). در هنگام آزمایش، نمونه های رقیق شده به داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژنهای هسته ای، این آنتی بادیها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند. پس از شستشو با افزودن آنتی بادی ضد IgG که به آنتیژن HRP متصل شده، در صورت وجود آنتی بادیهای ضد هسته ای از نوع IgG، آنتی بادی نشاندار شده نیز به آنها متصل می گردد. پس از شستشو، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است. افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت:

- (۱) یک عدد پلیت دارای ۹۶ عدد چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای هسته ای
- (۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent): دو ویال ۵۰ میلی لیتری حاوی محلول جهت رقیق کردن نمونه ها (آماده برای مصرف-آبی رنگ)
- (۳) کالیبراتور (Calibrator): شامل ۱ ویال ۲ میلی لیتری حاوی سرم انسان با مقدار مشخص از آنتی بادی ضد آنتی ژنهای هسته ای (آماده برای مصرف-بنفش رنگ)
- (۴) محلول آنزیم کوئزوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی محلول آنتی بادی ضد IgG انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز (آماده برای مصرف-قرمز رنگ)
- (۵) سرم کنترل مثبت (Positive Control): یک ویال ۲ میلی لیتری حاوی محلول بافری، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده، حاوی آنتی بادی IgG علیه آنتی ژنهای هسته ای (آماده برای مصرف-قرمز رنگ). غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است.
- (۶) سرم کنترل منفی (Negative Control): یک ویال ۲ میلی لیتری حاوی محلول دارای بافر فسفات و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادی IgG علیه آنتی ژنهای هسته ای (آماده برای مصرف-زرد رنگ)
- (۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف-بی رنگ)
- (۸) محلول شستشو (Wash Buffer): یک ویال ۵۰ میلی لیتری حاوی محلول شستشوی غلیظ (۱۰X) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توتین. جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمایید.
- (۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی اسیدکلریدریک ۱ نرمال
- (۱۰) یک عدد برچسب مخصوص پلیت
- (۱۱) دستورالعمل مصرف

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند:

- (۱) دستگاه الایزایدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس)
- (۲) سمپلرهای دقیق و کالیبره ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتری و سر سمپلرهای مخصوص یکبار مصرف
- (۳) لوله آزمایش برای رقیق سازی
- (۴) کاغذ نمگیر
- (۵) آب مقطر

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

- (۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند.
- (۲) تمامی محتویات کیت تنها برای استفاده تشخیصی در آزمایشگاه می باشند.
- (۳) تنها پرسنل آموزش دیده بایستی از این تست استفاده نمایند.
- (۴) این کیت صرفاً جهت اندازه گیری آنتی بادی های ضد آنتی ژنهای هسته ای در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است.
- (۵) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید.
- (۶) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBSAg و آنتی بادهای HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار میکنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.

۷) نمونه بیماران، کالبراتور، کنترلرها و چاهکهای استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمام محلولهای واکنش گر و معرفها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحاء شوند.

شرایط نگهداری:

- ۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.
- ۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید.
- ۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد.
- ۴) ممکن است در محلول شستشوی غلیظ کریستال تشکیل شود که این امر مشکلی را ایجاد نمی نماید. قبل از تهیه محلول شستشوی کار، برای حل شدن کریستالها، ویال را در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. محلول شستشو را به نسبت ۱/۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید. این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۲-۸ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از سلولهای خون استفاده نمود، نمونه می تواند برای مدت دو روز در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از دو روز (حداکثر ۳۰ روز) باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد (درضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود). از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود.

آماده سازی اولیه نمونه ها:

نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه). توجه: کنترلرها و کالبراتور کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند.

توضیحات عمومی:

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند. پلیت را بعد از رسیدن به دمای محیط از کیسه مخصوص آن خارج کرده و چاهک های مورد نیاز را بردارید.
- ۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند. از خشک شدن چاهک ها در بین مراحل انکوباسیون پرهیز شود.
- ۳) حتما از نوک سمپلر یکبار مصرف برای هر نمونه استفاده شود.
- ۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد.
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند.
- ۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می باشد. بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب آنها را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر می شود.
- ۷) شستشوی صحیح با مقدار مناسب بافر شستشو جهت حصول نتایج قابل اعتماد بسیار ضروری می باشد.

مراحل انجام آزمایش:

- (۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
- (۲) ۱۰۰ میکرولیتر از کالیبراتور، سرم های کنترل و نمونه های آماده شده را طبق دستور زیر در چاهکها بریزید.
اولین چاهک را برای کالیبراتور، دو چاهک بعدی را به ترتیب برای سرم کنترل مثبت و منفی و سایر چاهکها را برای نمونه ها استفاده کنید. پس از پوشاندن درب چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸-۳۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید. پیشنهاد می گردد کالیبراتور، کنترل ها و نمونه ها به صورت دوپلیکیت انجام شود بدین معنی که کالیبراتور، هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید.
- (۳) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. برای شستشو چنانچه دستگاه واشر اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد. در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهکها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو، چاهکها را درحالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند.
- (۴) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) آماده مصرف را به داخل چاهکها بریزید. پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸-۳۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید.
- (۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۳).
- (۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید. چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید.
- (۷) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید. توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد.

ارزشیابی آزمایش:

- این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد:
- جذب نوری کالیبراتور بیشتر از ۰/۱۷ قابل قبول است.
 - جذب نوری کنترل مثبت بیشتر از ۰/۸ و جذب نوری کنترل منفی کمتر از ۰/۱ قابل قبول است.

محاسبه نتایج:

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود.

- (۱) جذب نوری کالیبراتور، کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm بخوانید.
- (۲) نتایج با محاسبه نسبت میانگین جذب نوری نمونه یا کنترل به میانگین جذب نوری کالیبراتور محاسبه می گردد. فرمول زیر برای محاسبه نسبت استفاده می گردد:

$$\text{جذب نوری کنترل یا نمونه بیمار} = \frac{\text{جذب نوری کالیبراتور}}{\text{ایندکس}}$$

تفسیر نتایج به صورت زیر صورت می گیرد:

ایندکس > 0.9	منفی
ایندکس $0.9 - 1.1$	مشکوک
ایندکس ≤ 1.1	مثبت

شاخصهای اجرایی:

(۱) مطالعه مقایسه ای:

کیت سنجش آنتی بادی IgG علیه آنتی ژنهای هسته ای شرکت پیشداز طب با نمونه سرم های تایید شده با کیت تجاری مربوطه مقایسه شدند. نمونه های مثبت از جمعیت بیماران مراجعه کننده به یکی از مراکز ریفرال درمان بیماران روماتولوژیک انتخاب شدند. نتایج تست در جداول زیر آمده است.

تعداد نمونه مقایسه ای (۱۹۶)		کیت تجاری الایزای سنجش آنتی بادی IgG علیه آنتی ژنهای هسته ای		
		+	-	جمع
کیت الایزای سنجش آنتی بادی IgG علیه آنتی ژنهای هسته ای پیشداز طب زمان	+	۱۲۸	۸	۱۳۶
	-	۲	۵۸	۶۰
	جمع	۱۳۰	۶۶	۱۹۶

موارد متناقض بین دو کیت مقایسه شده به کمک کیت تجاری سوم مورد تصمیم گیری قرار گرفت. نتایج تست های مقایسه ای بر روی نمونه های ذکر شده بیانگر حساسیت ۸۷/۹٪، اختصاصیت ۹۸/۵٪ و صحت ۹۴/۸٪ برای کیت شرکت پیشداز طب است.

(۲) دقت آزمایش:

جهت بررسی تکرارپذیری کیت، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) به وسیله چهار نمونه سرمی با غلظت های متفاوت آنتی بادی IgG علیه آنتی ژنهای هسته ای انجام شد که نتایج آن در جداول مربوطه آمده است.

– آزمون دقت درون سنجی (Intra-assay):

CV (%)	SD	میانگین S/C	تعداد دفعات تکرار تست	
۶/۴۰	۰/۰۴۸	۰/۷۵	۲۰	نمونه منفی
۵/۶۵	۰/۰۸۷	۱/۵۴	۲۰	نمونه مثبت ضعیف
۴/۱۳	۰/۱۷۱	۴/۱۴	۲۰	نمونه مثبت قوی
۴/۹۰	۰/۴۰۵	۸/۲۷	۲۰	نمونه مثبت قوی

- آزمون دقت میان سنجی (Inter-assay):

تعداد دفعات تکرار تست	میانگین S/C	SD	CV (%)
۲۰	۰/۶۷	۰/۱۰	۱۴/۹۳
۲۰	۱/۵۳	۰/۱۴	۹/۱۵
۲۰	۴/۶۱	۰/۴۶	۹/۹۸
۲۰	۹/۷۱	۱/۰۲۶	۱۰/۵۷

۳) تداخل:

جهت بررسی تداخل کیت به سه نمونه سرم مقادیر زیر از عوامل مداخله گر هموگلوبین، تری گلیسرید و بیلی روبین اضافه و تغییرات میزان S/C نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله گر محاسبه شد و نتایج جدول زیر بدست آمد.

جدول نتایج:

آنالیت مداخله گر	غلظت آنالیت مداخله گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله گر (S/C)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله گر (S/C)	تفاوت نتایج (%)
هموگلوبین	1 mg/ml	0.84 7.28 9.71	0.79 7.41 9.56	-5.95 1.76 -1.5
تری گلیسرید	3000 mg/dl	0.84 7.28 9.71	0.82 7.32 9.73	-2.38 0.55 0.2
بیلی روبین	20 mg/dL	0.84 7.28 9.71	0.88 7.35 9.69	4.76 0.96 -0.21

References:

1. Tebo AE. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clin Vaccine Immunol. 2017;24(12):1-28.
2. Pisetsky DS, Bossuyt X, Meroni PL. ANA as an entry criterion for the classification of SLE. Autoimmun Rev. 2019 Dec;18(12):102400.
3. Gniewek RA, Stites DP, McHugh TM, Hilton JF, Nakagawa M. Comparison of antinuclear antibody testing methods: Immunofluorescence assay versus enzyme immunoassay. Clin Diagn Lab Immunol. 1997;4(2):185-8.
4. Elbagir S, Sohrabian A, Elshafie AI, Elagib EM, Mohammed NEA, Nur MAM, Svenungsson E, Gunnarsson I, Rönnelid J. Accumulation of antinuclear associated antibodies in circulating immune complexes is more prominent in SLE patients from Sudan than Sweden. Sci Rep. 2020 Dec 3;10(1):21126.
5. Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing-misunderstood or misbegotten? Nat Rev Rheumatol. 2017;13(8):495-502.
6. Choi MY, Cui J, Costenbader K, Rydzewski D, Bernhard L, Schur P. Different indirect immunofluorescence ANA substrate performance in a diagnostic setting of patients with SLE and related disorders: retrospective review and analysis. Lupus Sci Med. 2020 Nov;7(1):e000431.

7. Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, et al. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmun Rev.* 2011;10(12):801–8.
8. Pisetsky DS, Bossuyt X, Meroni PL. ANA as an entry criterion for the classification of SLE. *Autoimmun Rev.* 2019;18(12):102400.
9. Tan EM, Smolen JS, McDougal JS, Butcher BT, Conn D, Dawkins R, et al. A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities: I. Precision, sensitivity, and specificity. *Arthritis Rheum.* 1999;42(3):455–64.
10. Nosal RS, Superville SS, Varacallo M. Biochemistry, Antinuclear Antibodies (ANA). 2020 Sep 15. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. PMID: 30725756.
11. Ahmad A, Heijke R, Eriksson P, Wirestam L, Kechagias S, Dahle C, Sjöwall C. Autoantibodies associated with primary biliary cholangitis are common among patients with systemic lupus erythematosus even in the absence of elevated liver enzymes. *Clin Exp Immunol.* 2021 Jan;203(1):22-31.

روش انجام آزمایش سنجش آنتی بادی های IgG ضد هسته ای ANA به صورت شماتیک

نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید .

چاهکهای کوت شده با آنتی ژن های هسته ای			
محلولها	کالیبراتور	کنترل ها	نمونه
کالیبراتور	۱۰۰ میکرولیتر	–	–
کنترل ها	–	۱۰۰ میکرولیتر	–
نمونه آماده شده	–	–	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و آن را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو، ۵ بار چاهکها را بشویید.			
آنزیم کونژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و آن را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو، ۵ بار چاهکها را بشویید.			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در مقابل بلانک و در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید.			