

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung Parasiten-Diagnostik	Dokument: SA-MI-PARA Version: D Seite: 1/11
---	---	---

Änderungshinweis	<ul style="list-style-type: none"> - Einführung Serazym ELISA für <i>Gardia lamblia</i>, <i>Entamoeba histolytica</i>, <i>Cryptosporidium parvum</i> - Qualitätskontrolle - Beurteilung und Grenzen des Verfahrens - Ergebnisse und Befundbericht
------------------	---

Inhaltsverzeichnis

1. Zweck.....	2
1.1. Anforderung	2
2. Prinzip des Analysenverfahrens.....	2
3. Untersuchungsmaterial	3
4. Benötigte Geräte, Hilfsmittel und Materialien	3
5. Durchführung	4
5.1. Makroskopische Untersuchung des Stuhls	4
5.2. Mikroskopische Untersuchung	4
5.3. ELISA.....	6
5.3.1. <i>Probenvorbereitung</i>	6
5.3.2. <i>Testablauf</i>	6
6. Qualitätskontrolle	7
6.1. Durchführung der Kontrollen	7
6.2. Freigabe und Dokumentation der Ergebnisse.....	7
6.3. Maßnahmen bei Abweichung.....	7
7. Beurteilung und Grenzen des Verfahrens	7
7.1. Angabe von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenzen zu ELISA	7
8. Ergebnisse und Befundbericht	8
8.1. Angabe des Ergebnisses (inkl. Einheiten).....	8
8.2. Ergebnisdokumentation in der Labor – EDV Pkt. „Mikrobiologie“	8
8.3. Referenzbereiche.....	8
9. Hinweise und Störungen	9
10. Referenzen	9
11. Anlage.....	9

	erstellt	geprüft	freigegeben
Datum	04.12.14	04.12.14	04.12.14
Unterschrift			
Name	K. Pohl	A. Mähler	S. Arnoldt
Abteilung	Mikrobiologie	Mikrobiologie	QM-Beauftragte

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung Parasiten-Diagnostik	Dokument: SA-MI-PARA Version: D Seite: 2/11
---	---	---

1. Zweck

1.1. Anforderung

<u>Anforderung</u>	<u>EDV-Kürzel</u>
Parasiten im Stuhl	PARA
Protozoen	PROT
Lamblien	LAMB, LAMBE
Amöben	AMON, AMONE
Würmer/Wurmeier	WE
Cryptosporidien	CRYPT

Unter Parasiten im humanmedizinischen Sinn versteht man eukaryotische Organismen, die zeitweise oder ständig, ganz oder zum Teil auf Kosten eines Wirtes, in diesem Fall des Menschen, leben. Die Parasiten besiedeln als Endoparasiten das Körperinnere; Ektoparasiten sind auf der Körperoberfläche lokalisiert. Zielsetzung der Parasiten-Diagnostik ist der Nachweis und die Identifizierung von Wurmeiern, Helminthen und Protozoen aus klinisch relevantem Untersuchungsmaterial (z.B. Stuhl, Urin).

2. Prinzip des Analyseverfahrens

Es kommen in der Parasiten-Diagnostik makroskopisch, mikroskopische und immunenzymatische Untersuchungsmethoden zum Einsatz. Makroskopisch sichtbare Parasiten werden mit bloßem Augen, ggf. mit einer Lupe betrachtet. Erbringt eine makroskopische Untersuchung kein Ergebnis sind mikroskopische Verfahren anzuwenden. Es wird immer ein Nativpräparat und ein „Anreicherungs“-Präparat angefertigt. Das in dieser SA beschriebene Verfahren der Firma biosepar dient der Anreicherung und gleichzeitigen Färbung von Wurmeiern und Protozoen.

Desweiteren werden Enzymimmunoassays zum Nachweis von *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* und *Cryptosporidium parvum* durchgeführt.

Entamoeba histolytica

Ist ein ELISA auf der Basis polyklonaler Peptidantikörper, die zwei differente spezifische Epitope des Membranproteins erkennen. Dabei werden verdünnte, unbehandelte Stuhlproben mit Anti-SREHP Antikörpern inkubiert. Nach einem Waschschrift wird ein Peroxidase-markierter Antikörper zugegeben. Die ungebundenen Komponenten werden durch einen weiteren Waschschrift entfernt und im folgenden enzymatischen Reaktionsschrift wird die farblose Substratlösung in ein blaues Endprodukt umgewandelt.

Giardia lamblia

Ist ein ELISA auf der Basis polyklonaler Antikörper gegen *Giardia lamblia* Zystenwandprotein¹. Dabei werden verdünnte, unbehandelte Stuhlproben mit Anti-Gardia-Antikörpern inkubiert. Nach einem Waschschrift wird ein Peroxidase-markierter Antikörper zugegeben. Die ungebundenen Komponenten werden durch einen weiteren Waschschrift entfernt und im folgenden enzymatischen Reaktionsschrift wird die farblose Substratlösung in ein blaues Endprodukt umgewandelt.

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung Parasiten-Diagnostik	Dokument: SA-MI-PARA Version: D Seite: 3/11
---	---	---

Cryptosporidium parvum

Ist ein ELISA auf der Basis monoklonaler Antikörper gegen *Cryptosporidium parvum* spezifische Antigene. Dabei werden verdünnte, unbehandelte Stuhlproben mit Anti-*Cryptosporidium parvum*- Antikörpern inkubiert. Nach einem Waschschrift wird ein Peroxidase-markierter Antikörper zugegeben. Die ungebundenen Komponenten werden durch einen weiteren Waschschrift entfernt und im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt wird die farblose Substratlösung in ein blaues Endprodukt umgewandelt.

3. Untersuchungsmaterial

- Stuhl,
- Urin
- Analabklatschpräparate (Tesafilmpräparate)

4. Benötigte Geräte, Hilfsmittel und Materialien

- Petrischalen
- Spatel
- Objektträger
- Mikroskop mit Messokular

Mikroskopie:

im biosepar Kit enthalten sind:

- Arbeitsröhrchen 1 (gefüllt mit 3,5ml Medium A SAF)
- Arbeitsröhrchen 2 (mit integriertem Filtersystem)
- Braunglasflasche (mit graduiertem Tropfer)
- Combi-Medium zum Verarbeiten und Färben

ELISA (der Fa. SEKISUI Virotech GmbH):

Hilfsmittel:

- Washer
- Reader
- Impfösen
- Zellstoff
- sterile Röhrchen
- Zentrifuge
- Aqua dest.

Materialien:

- Mikrotiterplatten
- Waschpuffer, 9 + 1 verdünnbar, bei +2-8° 2 Monate haltbar
- Verdünnungsmedium
- Positiv Kontrolle
- Negativ Kontrolle
- POD Konjugat
- Substrat
- Stopplösung

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung Parasiten-Diagnostik	Dokument: SA-MI-PARA Version: D Seite: 4/11
---	---	---

5. Durchführung

5.1. Makroskopische Untersuchung des Stuhls

- Untersuchung mit Hilfe physiologischer Kochsalzlösung in Petrischalen
- Nach Bedarf mit Lupe näher bestimmen
- Artdiagnose adulter Trematoden, Zestoden und Nematoden

Proglottidenquetschpräparat

Taenia saginata und *Taenia solium* (Rinder- und Schweinebandwurm) lassen sich makroskopisch nicht voneinander unterscheiden. Sie können aber an Hand ihrer Proglottiden differenziert werden:

Die Uteruskonfiguration beider Taenien ist unterschiedlich aufgebaut. Im Wesentlichen besitzt *T.saginata* mehr Verzweigungen im Uterus (18-32 je Seite) als *T. solium* (7–12 je Seite).

Bei schlecht erhaltenen Proglottiden kann mittels einer feinen Kanüle etwas Tusche in den Uterus injiziert werden.

Technik: Das Proglottid sollte dazu zwischen zwei Objektträger gebracht und gequetscht werden. Anschließend den Objektträger gegen das Licht halten und Verästelungen betrachten. Dabei sollte grundsätzlich unter der Werkbank gearbeitet und Handschuhe getragen werden. **Infektionsgefahr!!!**

Analtupfverfahren

- Zum Nachweis *Enterobius vermicularis*
- Analregion mit Tesaklebestreifen abtupfen
- Streifen wird mit kontaminierter Seite nach oben auf Objektträger geklebt und mit Tropfen H₂O und nachfolgend mit Deckglas bedeckt.
- Bei negativen Befunden mehrmals an verschiedenen Tagen

5.2. Mikroskopische Untersuchung

Frischpräparat

- Öse voll frischer, mglst noch warmer Stuhl mit Tropfen NaCl auf Objektträger
- erbsengroße Menge Stuhl mit 2-3ml NaCl → 1Tropfen auf Objektträger mit Deckglas (200 und 400fache Vergrößerung)
- Sichtbar:
 - bewegliche Stadien
 - Zysten und Trophozoen von Flagellaten und Amöben mit Iod-Kaliumiodid-Lösung (1Tropfen) deutlicher sichtbar

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung Parasiten-Diagnostik	Dokument: SA-MI-PARA Version: D Seite: 5/11
---	--	---

Färbungen

- Nativpräparat → Zysten und Trophozoiten von Flagellaten und Amöben mit Tropfen **Jod** anfärben (vorhandenes Glykogen wird gelbbraun gefärbt)
 - fixiertes Präparat → Darstellung von Cryptosporidium-Oozysten (häufig bei HIV-Patienten) mit Hilfe **Ziehl-Neelson-Färbung**
 - o luftgetrockneter Ausstrich für 2-3 Minuten mit Methanol fixieren
 - o 5-10 Minuten mit Phenol-Fuchsin färben
 - o Entfärben mit 1%iger HCl-Alkohol
 - o Spülung mit Leitungswasser
 - o Gegenfärbung mit Methylenblau 30sec
 - o Spülung mit Leitungswasser
- Oozysten erscheinen als rosige, lila Kugeln vor blauen Hintergrund

Anreicherungsverfahren

- Nachweis von Protozoen, Wurmeiern und Wurmlarven
- SAF-Verfahren → dient zur Anreicherung und Färbung mit nachfolgender Mikroskopie
- In der Regel 3 Stuhlproben von 3 Tagen mit max. 1-3 Tagen Abstand

Durchführung:

- 1) Füllen des Stempels mit dem *Probematerial* (Stempel darf nur gestrichen voll sein). Einbringen des Probematerials in das Röhrchen I
- 2) Röhrchen mit Verschlusskappe fest verschließen, Intensives *Vermischen* des Probematerials durch Schütteln.
- 3) Falls notwendig, die Verschlusskappe mit dem Stempel schnell auf und ab bewegen. Stempel muss dabei immer in der Flüssigkeit bleiben.
- 4) Stempel mit Verschlusskappe entfernen
- 5) *1,5 ml Combi-Medium* dazu geben
- 6) *Röhrchen I und Röhrchen II* mit dem integrierten Filtersystem verbinden. Gekoppeltes System 180° drehen.
- 7) Mit einem Schüttelgerät bei max. Drehzahl ca. 10-15 Sek. *schütteln*. Nach diesem Arbeitsgang ist bereits die Hälfte der Suspension im unteren spitzen Arbeitsröhrchen II.
- 8) Inhalt durch *Schütteln* in das Röhrchen II bringen, ähnlich wie bei einem alten Fieberthermometer (zweite, aktive Feinfiltration).
- 9) *Sedimentation*, Trennprozess durch *Zentrifugieren*; *10 min. 1500 g*.
- 10) Nach dem Zentrifugieren bilden sich *vier Schichten* aus. Röhrchen I mit dem Filterstück entfernen.
- 11) Die oberen flüssigen Schichten vorsichtig *dekantieren*.
- 12) Den *Bodensatz* mit physiologischer Kochsalzlösung aufschwemmen (0,1 bis 0,5ml)

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung Parasiten-Diagnostik	Dokument: SA-MI-PARA Version: D Seite: 6/11
---	--	---

- 13) Den aufgeschwemmten Niederschlag auf den Objektträger bringen, mit Deckglas bedecken. Durch den Objektträger muss ein Text noch gut lesbar sein. Zu dicke Präparate erschweren die Beurteilung und verschlechtern die Ausbeute. Es werden immer 2 Präparate zur Untersuchung angefertigt.
- 14) Mikroskopische Auswertung am Mikroskop bei 100-1000facher Vergrößerung.

5.3. ELISA

→ alle 3 ELISA´s werden nach dem gleichen Schema abgearbeitet

5.3.1. Probenvorbereitung

Die Abarbeitung der Stuhlproben erfolgt unter der Sicherheitswerkbank!

- alle Testkomponenten und Patientenproben auf Raumtemperatur bringen
- Es werden 1ml Probenverdünnungspuffer in Universalröhrchen vorgelegt
- dazu werden ca. 200 µl flüssiger Stuhl oder ein erbsengroßes Stück fester Stuhl mit dem Wattetupfer gegeben und suspendiert, kurz vortexen
- Probe für 5 min bei 2500 g zentrifugieren
- vom Überstand werden 100 µl direkt je Test eingesetzt

5.3.2. Testablauf

- Erste Inkubation:
 - Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in die Halterung
 - 3 Tropfen der Positivkontrolle, der Negativkontrolle und des Überstandes der Stuhlprobensuspension in die Vertiefung tropfen
 - 60 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Waschen: → mit Hilfe des Washers (siehe PA-MI-412) Programm: 5xWash manuell, bei Defekt des Gerätes:
 - die Kavitäten werden geleert und anschließend auf den Labortüchern ausgeklopft, um Restfeuchtigkeit zu entfernen
 - 5 mal mit 300µl Waschpuffer waschen, jedes Mal für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen sorgen
- Zweite Inkubation:
 - zu jeder Probe werden 3 Tropfen der **CONJ HRP** Konjugat – Lösung gegeben
 - 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Waschen: → mit Hilfe des Washers (siehe PA-MI-412) Programm: 5xWash manuell, bei Defekt des Gerätes:
 - die Kavitäten werden geleert und anschließend auf den Labortüchern ausgeklopft, um Restfeuchtigkeit zu entfernen
 - 5 mal mit 300µl Waschpuffer waschen, jedes Mal für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen sorgen

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung Parasiten-Diagnostik	Dokument: SA-MI-PARA Version: D Seite: 7/11
---	--	---

- Dritte Inkubation:
 - Zugabe von 3 Tropfen **SUBSTR TMB** Substratlösung in alle Vertiefungen
 - 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubieren
- Stopp - Reagenz für die photometrische Messung
 - Zugabe von 3 Tropfen **STOP** Stopplösung auf alle Vertiefungen gegeben
 - nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen gegen den Plattenrand) erfolgt die Messung am Reader

→ [genauere Durchführung siehe PA-MI-413](#)

6. Qualitätskontrolle

6.1. Durchführung der Kontrollen

→ Die Kontrollen werden bei jedem ELISA Ansatz mitgeführt und auf FB 22 „Qualitätskontrolle“ dokumentiert

- positiv Kontrollen
→ Extinktion $\geq 0,8$
- negativ Kontrolle
→ Extinktion $\leq 0,2$

6.2. Freigabe und Dokumentation der Ergebnisse

Die Überprüfung der Qualitätskontrollen erfolgt durch die Software. Die Patientenergebnisse werden manuell in die Labor – EDV eingegeben.

Die Readerausdrucke werden unterschrieben, von einem 2. Mitarbeiter gegengelesen und abgeheftet.

6.3. Maßnahmen bei Abweichung

Kontrolle der Kitkomponenten visuell auf Kontamination oder Undichtigkeit .

Prüfung der Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte.

Neuer Testansatz ggf. mit neuem Reagenzienkit.

7. Beurteilung und Grenzen des Verfahrens

Die mikroskopische Durchmusterung der angefertigten Präparate erfolgt über einen Zeitraum von 10 Minuten und wird mäanderförmig durchgeführt werden. Verdächtige Strukturen sind durch einen zweiten erfahrenen Mitarbeiter bestätigen zu lassen.

7.1. Angabe von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenzen zu ELISA

- Der Test kann keine quantitative Aussage treffen, somit sollten die Testergebnisse immer im Zusammenhang mit dem klinischen Bild und/oder anderen Testverfahren interpretiert werden.

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung Parasiten-Diagnostik	Dokument: SA-MI-PARA Version: D Seite: 8/11
---	---	---

- Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche Infektion nicht aus.
→ bei begründeten Verdacht Kontrolle mit neuer Stuhlprobe
- Ein grenzwertiges Ergebnis kann durch eine inhomogene Verteilung des Antigens in der Stuhlprobe verursacht werden → zweite Suspension der gleichen Stuhlprobe untersuchen oder Kontrolle mit einer frischen Stuhlprobe.

8. Ergebnisse und Befundbericht

Die mikroskopischen Ergebnisse (End- bzw. Zwischenergebnisse) werden anhand der Arbeitsplatzliste Parasiten (PA) erfasst, gespeichert und gedruckt (siehe AA-MI-EDV).

8.1. Angabe des Ergebnisses (inkl. Einheiten)

➤ automatische Auswertung durch Reader:

- *Gardia lamblia*/ *Cryptosporidium parvum*
▪ *cut off* = *Extinktionswert der Negativkontrolle* + 0,1
- *Entamoeba histolytica*
▪ *cut off* = *Extinktionswert der Negativkontrolle* + 0,2

positiv → = Patientenproben, deren Extinktionswert mehr als 10% über dem Cut-off liegt
negativ → = Patientenproben, deren Extinktionswert mehr als 10% unter dem Cut-off liegt
grenzwertig = Patientenproben, deren Extinktionswert bis 10% über oder unter dem Cut-off liegt → **Ansatz mit neuer Suspension wiederholen, wird erneut ein Wert im Grenzbereich gemessen, so ist die Probe als negativ zu bewerten**

8.2. Ergebnisdokumentation in der Labor – EDV Pkt. „Mikrobiologie“

→ B05 Resultate → Arbeitsplatz → PA

Gardia lamblia:	positiv → GALP negativ → GALN
Entamoeba histolytica:	positiv → ENTP negativ → ENTN
Cryptosporidium parvum:	positiv → CRYPP negativ → CRYPN

8.3. Referenzbereiche

negativ

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung Parasiten-Diagnostik	Dokument: SA-MI-PARA Version: D Seite: 9/11
---	---	---

9. Hinweise und Störungen

Pilze (Sprosspilze) sind ein Indikator für eine zufriedenstellende Anreicherung der Probe. Es sollte außerdem auf eine sehr saubere Arbeitsweise geachtet werden, da ansonsten die Möglichkeit einer Infektion besteht.

10. Referenzen

1. Mikrobiologische Diagnostik Neumeister 2.Auflage Thieme 2009
2. MIQ 4, 1998, Parasitosen

11. Anlage

Kurzbeschreibung Durchführung Sedimentationsverfahren
Kurzbeschreibung Abarbeitung Stuhl-ELISA
Packungsbeilagen
Informationsmaterial
Sammelhefter Abbildungen

Medizinisches Zentrallabor Altenburg	Standardarbeitsanweisung Parasiten-Diagnostik	Dokument: SA-MI-PARA Version: D Seite: 10/11
---	--	--

Kurzbeschreibung Durchführung Sedimentationsverfahren

1) Füllen des Stempels mit dem **Probematerial** (Stempel darf nur gestrichen voll sein).
Einbringen des Probematerials in das Röhrchen I

2) Röhrchen mit Verschlusskappe fest verschließen. Intensives Vermischen des Probematerials durch **Schütteln**.



3) Falls notwendig, die Verschlusskappe mit dem Stempel schnell auf und ab bewegen. Stempel muss dabei immer in der Flüssigkeit bleiben.



4) Stempel mit **Verschlusskappe entfernen**



5) **1,5 ml Combi-Medium** dazu geben



6) **Röhrchen I und Röhrchen II** mit dem integrierten Filtersystem verbinden. Gekoppeltes System 180° drehen.



7) Mit einem Schüttelgerät bei max. Drehzahl ca. **10-15 Sek. schütteln**.
Nach diesem Arbeitsgang ist bereits die Hälfte der Suspension im unteren spitzen Arbeitsröhrchen II.



8) Inhalt durch Schütteln in das **Röhrchen II** bringen, ähnlich wie bei einem alten Fieberthermometer (zweite, aktive Feinfiltration).



9) Sedimentation, Trennprozess durch Zentrifugieren; **10 min. 1500 g**.



10) Nach dem Zentrifugieren bilden sich vier Schichten aus.
Röhrchen I mit dem **Filterstück entfernen**.



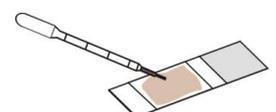
11) Die oberen flüssigen Schichten vorsichtig **dekantieren**.



12) Den Bodensatz mit physiologischer Kochsalzlösung **aufschwemmen** (0,1 bis 0,5ml)



13) Den aufgeschwemmten Niederschlag auf den **Objektträger** bringen, mit Deckglas bedecken. Durch den Objektträger muss ein Text noch gut lesbar sein. Zu dicke Präparate erschweren die Beurteilung und verschlechtern die Ausbeute. Es werden immer 2 Präparate zur Untersuchung angefertigt.



14) Mikroskopische Auswertung am **Mikroskop** bei 100-1000facher Vergrößerung.



-ELISA Abarbeitung Serazym®

Serazym Adenovirus

Serazym Rotavirus

Serazym Astrovirus

Anlage zu SA-MI-VIREN

2 Tropfen (oder 75 µl) **CONJ HRP** (6)
 +
 75 µl **CONTROL +** (4)
 75 µl **CONTROL -** (5)
 50 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren, kurz schütteln
 60 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
 2 Tropfen (oder 75 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min Inkubation (Raumtemperatur, lichtgeschützt)
 2 Tropfen (oder 75 µl) **STOP** (8)

Messung der OD bei 450 / ≥ 620 nm

Serazym Norovirus

Anlage zu SA-MI-VIREN

Serazym Giardia lamblia

Entamoeba histolyt.

Cryptosp. parvum

Anlage zu SA-MI-PARA

100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren
 60 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
 3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** (6)
 30 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
 3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min Inkubation (Raumtemperatur, lichtgeschützt)
 3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** (8)

Messung der OD bei 450 / ≥ 620 nm

Serazym Clostridium difficile GDH

Anlage zu SA-MI-CLOS

3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** (6)
 +
 100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren, kurz schütteln
 60 min Inkubation (Raumtemperatur)
 alternativ: 30 min unter Schütteln
 5x Waschen mit Waschlösung
 3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min Inkubation (Raumtemperatur, lichtgeschützt)
 3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** (8)

Messung der OD bei 450 / ≥ 620 nm

Serazym Clostridium difficile Toxin A+B

Anlage zu SA-MI-CLOS

Serazym Verotoxin 1+2 (Anlage zu SA-MI-EHEC)

120 µl **CONTROL +** (4)
 120 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **verdünnte Stuhlkulturprobe** pipettieren
 60 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
 3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ BIOTIN** (6/1)
 30 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
 3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ STREPT** (6/2)
 30 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
 3 Tropfen (oder 120 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 15 min Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur)
 3 Tropfen (oder 120 µl) **STOP** (8)

Messung der OD bei 450 / ≥ 620 nm