

**VIROTECH Adenovirus IgG/IgM ELISA
(Adenovirus IgG/IgM ELISA)**

Bestell-Nr.: EC121.00

Adenovirus IgA-Set

Bestell-Nr.: EC121.08

Farbcodierung: dunkelblau/transparent

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

**Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Freigabedatum: 31.1.2019

REV 14 / VIROTECH Adenovirus IgG/IgM/IgA ELISA DE

Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung.....	3
3. Testprinzip.....	3
4. Packungsinhalt.....	3
4.1 IgG/IgM Testkit	3
4.2 IgA Set	3
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	4
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)	4
8. Testdurchführung	4
8.1 Untersuchungsmaterial	5
8.2 Vorbereitung der Reagenzien	5
8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung.....	5
8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren.....	5
9. Testauswertung.....	6
9.1 Testfunktionskontrolle	6
9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE).....	6
9.3 Auswertungsschema IgG, IgM und IgA.....	6
9.4 Grenzen des Tests	7
10. Leistungsdaten.....	7
10.1 Sensitivität und Spezifität	7
10.2 Durchseuchung (erwartete Werte).....	7
10.3 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)	7
10.4 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit).....	7
11. Literatur	8
12. Testablaufschema	9

1. Verwendungszweck

Der ELISA dient dem qualitativen und semiquantitativen Nachweis von IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern gegen Adenoviren in Humanserum.

2. Diagnostische Bedeutung

Die humanen Adenoviren gehören zur Gattung Mastadenovirus der Familie Adenoviridae. (1)

Es handelt sich um hüllenlose Viren mit linearer doppelsträngiger DNA. Sie werden aufgeteilt in die Subgenera A-F. Es sind bislang 49 Serotypen beschrieben (2). Nur eine geringe Zahl verursacht wirkliche Infektionskrankheiten. Die meisten bleiben subklinisch (3).

Die Übertragung erfolgt entweder fäkal-oral, über Aerosole oder auch augenärztliche Instrumente (Keratokonjunktivitis epidemica). Die Inkubationszeit beträgt 5-8 Tage.

Adenoviren verursachen Erkrankungen des oberen und unteren Respirationstraktes, Gastroenteritis bei Kindern (Typen 40 und 41, zweithäufigster Gastroenteritiserreger nach Rotaviren), epidemische Keratokonjunktivitis (Typen 8, 19 und 37) und akute hämorrhagische Cystitis (Typ 11).

Nach einer Infektion bleibt eine langdauernde serotypspezifische Immunität (2).

Für Adenoviren steht bisher keine spezifische Immunprophylaxe oder Therapie zur Verfügung, obwohl insbesondere an der Suche nach Antiviralia intensiv gearbeitet wird (4).

Differentialdiagnostisch kommen für akute untere Respirationstraktinfektionen Parainfluenzaviren, Adenoviren, RSV, Influenzaviren, Rhinoviren, Enteroviren oder Chlamydia trachomatis bzw. Pneumocystis carinii, wenn Zeichen einer Immunsuppression vorliegen, in Frage (5).

Der Antigennachweis wird bei akuter Gastroenteritis, Keratokonjunktivitis und respiratorischem Infekt durchgeführt. Der nicht typspezifische Elisa wird zur unterstützenden Diagnostik bei respiratorischen Infekten eingesetzt (6).

3. Testprinzip

Der im Humanserum gesuchte Antikörper bildet mit dem auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigen einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzym-Konjugat. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) entsteht durch Enzymaktivität (Peroxidase) ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt.

4. Packungsinhalt

4.1 IgG/IgM Testkit

1. **1 Mikrotiterplatte**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig) 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert) 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
4. **IgG negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgG cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgG positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgM negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
8. **IgM cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
9. **IgM positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
10. **IgG-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
11. **IgM-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
12. **Tetramethylbenzidin - Substratlösung (3,3',5,5' TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
13. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

4.2 IgA Set

1. **IgA negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
2. **IgA cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig

3. **IgA positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
4. **IgA-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

1. Nach Entnahme der benötigten Einzelkavitäten die restlichen Einzelkavitäten/Streifen in verschlossenem Beutel mit Trockenmittel bei 2-8°C lagern. Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder bei 2-8°C lagern.
2. Das gebrauchsfertige Konjugat und die TMB Substratlösung sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Kommt es durch Lichteinfall zu einer Farbentwicklung der Substratlösung, so ist diese zu verwerfen.
3. Nur die für den Testansatz benötigte Menge vom gebrauchsfertigen Konjugat bzw. TMB entnehmen. Zuviel entnommenes Konjugat bzw. TMB darf nicht zurückgeführt werden sondern ist zu verwerfen.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	verdünnt	+2 bis +8°C	max. 6h
	unverdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
MTP	nach Öffnen	+2 bis +8° (Lagerung im mitgelieferten Beutel mit Trockenmittelbeutel)	3Monate
RF Sorbo Tech	unverdünnt, nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
TMB	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
Stopplösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +25°C	4Wochen

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. Als Kontrollseren werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten alle Proben, verdünnte Proben, Kontrollen, Konjugate und die Mikrotiterstreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, Citrat-Stopp-Lösung und TMB wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Bei Berührungen die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell den Arzt aufsuchen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Aqua dest./demin.
2. Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
3. Mikropipetten: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Reagenzgläser
5. Zellstofftücher
6. Abdeckung für ELISA-Platten
7. Abfallbehälter für infektiöses Material
8. ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
9. Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
10. Brutschrank

8. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für das Erzielen korrekter Ergebnisse.

8.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Gebrauchsanweisung nur Serum erwähnt ist.

Patienten-Verdünnungen immer frisch ansetzen.

Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren eingefroren werden. Mehrmaliges Auftauen sollte vermieden werden.

1. Nur frische, nicht inaktivierte Seren benutzen.
2. Hyperlipämische, hämolytische, mikrobiell kontaminierte Proben und trübe Seren nicht verwenden (falsch positive/negative Ergebnisse).

8.2 Vorbereitung der Reagenzien

Die VIROTECH Diagnostics System Diagnostik bietet ein hohes Maß an Flexibilität durch die Möglichkeit, Verdünnungs- und Waschpuffer, TMB, Citrat-Stopplösung sowie Konjugat parameter- und chargenübergreifend einzusetzen. Die gebrauchsfertigen Kontrollen (positive Kontrolle, cut-off Kontrolle, negative Kontrolle) sind parameterspezifisch und ausschließlich mit der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Plattencharge zu verwenden.

1. Brutschrank auf 37°C einstellen und sich vor Inkubationsbeginn vom Erreichen der Temperatur überzeugen.
2. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen; erst dann die Verpackung mit den Teststreifen öffnen.
3. Alle Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln.
4. Waschlösungs-Konzentrat auf 1Liter mit Aqua dest./demin. auffüllen (bei eventueller Kristallbildung des Konzentrates dieses bitte vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut schütteln).
5. Hohe IgG-Titer oder Rheumafaktoren können den spezifischen Nachweis von IgM-Antikörpern stören und zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen. **Für eine korrekte IgM-Bestimmung ist es daher erforderlich, die Seren mit RF-SorboTech (VIROTECH-Adsorptionsmittel) vorzubehandeln.** Bei IgM-Kontrollen entfällt die Voradsorption.

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

1. Pro Testansatz 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der negativen-, cut-off und der positiven IgG-, IgM- und IgA-Kontrolle, sowie der verdünnten Patientenserum pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz (Leerwert, Kontrollen und Patientenserum); bei der cut-off Kontrolle ist ein Doppelansatz zwingend notwendig. Arbeitsverdünnung der Patientenserum: 1+100; z.B. 10µl Serum + 1ml Verdünnungspuffer.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C (mit Abdeckung).
3. Beenden der Inkubationsperiode durch 4 maliges Waschen mit je 350-400µl Waschlösung pro Kavität. Waschlösung nicht in den Kavitäten stehen lassen, sondern letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernen.
4. 100µl des gebrauchsfertigen Konjugats in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation der Konjugate: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung).
6. Beenden der Konjugatinkubation durch 4 maliges Waschen (siehe Pkt. 3).
7. 100µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
8. Inkubation der Substratlösung: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung, dunkel stellen).
9. Abstoppen der Substratreaktion: in alle Kavitäten je 50µl Citrat-Stopplösung pipettieren. Die Platte vorsichtig und sorgfältig schütteln bis sich die Flüssigkeiten vollständig durchmischt haben und eine einheitliche gelbe Farbe sichtbar wird.
10. Extinktionen bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm) messen. Photometer so einstellen, dass der gemessene Leerwert von allen anderen Extinktionen abgezogen wird. Die photometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

Testablaufschema siehe letzte Seite

8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren

Alle VIROTECH Diagnostics ELISAs können mit Hilfe von ELISA-Prozessoren abgearbeitet werden. Der Anwender ist verpflichtet eine regelmäßige Gerätevalidierung durchzuführen.

VIROTECH Diagnostics empfiehlt die folgende Vorgehensweise:

1. Bei Gerätestellung bzw. größeren Reparaturen Ihres ELISA Prozessors empfiehlt VIROTECH Diagnostics, die Validierung des Gerätes gemäß den Vorgaben des Geräteherstellers vorzunehmen.
2. Es wird empfohlen, anschließend den ELISA Prozessor mit dem Validierungskit (EC250.00) zu überprüfen. Diese regelmäßige Überprüfung mit dem Validierungskit sollte mindestens einmal pro Quartal durchgeführt werden.
3. Bei jedem Testlauf müssen die Freigabekriterien des Qualitätskontrollzertifikates zum Produkt erfüllt werden.

Diese Vorgehensweise gewährleistet die einwandfreie Funktion Ihres ELISA Prozessors und dient darüberhinaus der Qualitätssicherung des Labors.

9. Testauswertung

Die gebrauchsfertigen Kontrollen dienen einer semiquantitativen Bestimmung spezifischer IgG- IgA- und IgM-Antikörper, deren Konzentration in VIROTECH Einheiten (=VE) angegeben wird. Durch die Testdurchführung bedingte Schwankungen werden über die Berechnungsmethode ausgeglichen und es wird damit eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht. Für die Berechnung der VE werden die Mittelwerte der OD-Werte eingesetzt.

9.1 Testfunktionskontrolle

a) OD-Werte

Der OD-Wert des Leerwertes sollte <0,15 sein.

Die OD-Werte der negativen Kontrollen sollten unterhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte, die OD-Werte der positiven Kontrollen sowie der cut-off Kontrollen sollten oberhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

b) VIROTECH Einheiten (VE)

Die VIROTECH Einheiten (VE) der cut-off Kontrollen sind mit 10 VE definiert. Die berechneten VE der positiven Kontrollen sollten innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen.

Werden die Anforderungen (OD-Werte, VE) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)

Die Extinktion des Leerwertes (450/620nm) muß von allen Extinktionen abgezogen werden.

$$VE_{\text{(positive Kontrolle)}} = \frac{OD_{\text{(positive Kontrolle)}}}{OD_{\text{(cut-off Kontrolle)}}} \times 10$$

$$VE_{\text{(Patientenserum)}} = \frac{OD_{\text{(Patientenserum)}}}{OD_{\text{(cut-off Kontrolle)}}} \times 10$$

9.3 Auswertungsschema IgG, IgM und IgA

Ergebnis (VE)	Beurteilung
< 9,0	negativ
9,0 - 11,0	grenzwertig
> 11,0	positiv

1. Liegen die gemessenen VE der Probe oberhalb des grenzwertigen Bereiches, so werden die Proben als positiv betrachtet.
2. Befinden sich die gemessenen VE innerhalb des angegebenen grenzwertigen Bereiches, liegt keine signifikant hohe Antikörperkonzentration vor; die Proben werden als grenzwertig betrachtet. Für den sicheren Nachweis einer Infektion ist es erforderlich, den Antikörpergehalt zweier Serumproben zu bestimmen. Eine Serumprobe sollte direkt nach Beginn der Infektion, eine zweite Probe 5-10 Tage später (rekonvaleszentes Serum) getestet werden. Die Antikörperkonzentration beider Proben muß parallel, d.h. in einem Testansatz bestimmt werden. Eine korrekte Diagnose aufgrund der Bewertung einer einzelnen Serumprobe ist nicht möglich.
3. Liegen die gemessenen Werte unterhalb des definierten grenzwertigen Bereiches, sind keine messbaren antigenspezifischen Antikörper in der Probe vorhanden. Die Proben werden als negativ betrachtet.

- Ein positives IgG Ergebnis spricht entweder für eine vor längerer Zeit durchgemachte Infektion oder für eine frische Infektion.
Ein positives IgM Ergebnis spricht für eine akute Infektion und ein positives IgA Ergebnis spricht für eine relativ akute Reinfektion, denn IgA kann Monate persistieren.
Ein negatives Ergebnis spricht dafür, dass der Patient nicht infiziert war bzw. ist.

9.4 Grenzen des Tests

- Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.
- Anti-Doppelstrang DNS (α -dsDNS) Seren (ANA, systemischer Lupus erithematodes) zeigen Kreuzreaktivität zum VIROTECH Diagnostics Adenovirus ELISA.
- Zu beachten ist:
Durch eine Kreuzreaktivität mit einem anderen Erreger oder mit außergewöhnlich hoch konzentrierten Serumbestandteilen ist es in Ausnahmen möglich, dass der Test falsch positive Ergebnisse anzeigt.
Bei Nonrespondern, immunsuprimierten Patienten oder bei einer zu frühen Abnahme können falsch negative Ergebnisse auftreten.

10. Leistungsdaten

10.1 Sensitivität und Spezifität

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität wurden Seren im VIROTECH ELISA und im ELISA eines Mitbewerbers getestet.

Serenkollektiv (IgG n=300, IgM n=286)

Mitbewerber	VIROTECH Adenovirus ELISA			
	IgG		IgM	
	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
Negativ	91	18	190	3
Positiv	0	164	5	62

Grenzwertige Ergebnisse sind in die Berechnungen der Sensitivität und Spezifität nicht mit einbezogen worden. Für den VIROTECH Adenovirus ELISA ergeben sich folgende Werte:

	IgG	IgM
Sensitivität	>99,8%	92,5
Spezifität	83,5	98,4

10.2 Durchseuchung (erwartete Werte)

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse von Blutspenderseren für IgG (n=119), IgM (n=80) und IgA (n=119)

	IgG	IgM	IgA
Negativ	6	80	90
Grenzwertig	7	0	10
Positiv	106	0	19

10.3 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit einem Serum getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient beträgt < 9% (bei einem mittleren OD - Wert von 0,37).

10.4 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

In 12 unabhängigen Testansätzen wurden in verschiedenen Labors und von verschiedenen Testpersonen 3 Seren getestet.

Adenovirus ELISA IgG

Serum	Mittelwert VE	Variationskoeffizient
Negativ	8,1	6,2%
Positiv	13,9	4,9%
Positiv	31,2	6,2%

11. Literatur

1. Thomas Porstmann (Hrsg.), Virusdiagnostik, Diagnostische Bibliothek Band 1, Blackwell Wissenschaft 1996, S. 104
2. http://virologie.medizin.uni-essen.de/html/analysen/ana_adeno.htm erstellt von Dr. R. Scheidhauer, letzte Änderung: 21.05.2002
3. <http://www.vu-wien.ac.at/i123/SPEZVIR/ADENOGEN1.HTML> (Veterinärmedizinisches Institut der Universität Wien), Stand Juni 2003
4. Thomas Porstmann (Hrsg.), Virusdiagnostik, Diagnostische Bibliothek Band 1, Blackwell Wissenschaft 1996, S. 113
5. Brandis, Köhler, Eggers, Pulverer, Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, 7. Auflage, Fischer 1994, S.839
6. Mikrobiologische Diagnostik und Krankenhaushygiene, MVP, 2. Ausgabe, Stand Jan 2003, S. 48 und 64

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

Waschlösung: Konzentrat auf 1 Liter mit aqua dest./demin. auffüllen	
IgG-/IgA-Proben Æ Verdünnung 1:101	IgM-Proben Æ Verdünnung 1:101
z.B.: 10 µl Serum/Plasma + 1000 µl Verdünnungspuffer (Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)	z.B.: 5 µl Serum/Plasma + 450 µl Verdünnungspuffer + 1 Tropfen RF-SorboTech bei RT 15 min inkubieren
Rheumafaktoradsorption mit RF-SorboTech	

Testdurchführung

Probeninkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Patientenproben Leerwert (Verdünnungspuffer) und Kontrollen
↓		
4 x Waschen		400 µl Waschlösung gut ausklopfen
↓		
Konjugatinkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Konjugat IgG, IgM, IgA
↓		
4 x Waschen		400 µl Waschlösung gut ausklopfen
↓		
Substratinkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Substrat
↓		
Abstoppen		50 µl Stopplösung vorsichtig schütteln
↓		
Extinktion messen		Photometer bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm)