

RIDASCREEN[®] Clostridium perfringens Enterotoxin

Art. No.: C0601



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Anwendungsbereich

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von *Clostridium perfringens* Enterotoxin in humanen Stuhlproben.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Clostridium perfringens ist wie alle anderen Clostridien ein ubiquitär verbreitetes, Sporen bildendes, grampositives, anaerobes Bakterium, welches auch regelmäßig in der Dickdarmflora des Menschen zu finden ist. Es unterscheidet sich von den anderen Clostridien durch das Fehlen einer peritrichen Begeißelung. Man unterscheidet 5 *Clostridium perfringens*-Typen (A-E). Während für den Menschen hauptsächlich Typ A und unter besonderen Umständen (Diät, Trypsinmangel) Typ C, der die Enteritis necroticans hervorruft, bedeutend sind, sind bei Tieren alle Typen zu finden.

Die Einteilung in diese Gruppen steht in Zusammenhang mit der Bildungsfähigkeit der Haupttoxine (alpha-, beta-, epsilon- und iota-Toxin), die allesamt zytotoxisch und nekrotisierend wirken. Neben diesen vier Haupttoxinen produzieren bestimmte Stämme von *C. perfringens* eine Reihe weiterer Toxine von denen das Enterotoxin, ein 35-kDa großes Polypeptid, für den Menschen pathogenetisch bedeutsam ist.

Mit der Aufnahme unsachgemäß gelagerter, insbesondere schon einmal vorgegarter Speisen, können große Mengen von *C. perfringens* aufgenommen werden. Diese bilden in der Folge große Mengen an Enterotoxin (CPE) und es kommt zur Darmerkrankung mit Durchfall und Bauchkrämpfen. Die Symptomatik setzt etwa 8 - 24 Stunden nach Verzehr der kontaminierten Speise ein und klingt nach weiteren 24 Stunden wieder ab. Erbrechen, Fieber und Kopfschmerzen sind eher seltene Begleiterscheinungen. Neben der Lebensmittelvergiftung ist *C. perfringens* auch Verursacher von Antibiotika-assoziierten Diarrhoen (AAD) in etwa 10 % aller Fälle sowie in 5 - 20 % der Fälle sporadisch auftretender Diarrhoen (SPOR), die nicht durch Lebensmittelvergiftungen verursacht werden. Diese Form der Durchfallerkrankungen bis hin zur pseudomembranösen Colitis (PMC) verläuft wesentlich schlimmer und ist von längerer Dauer (10 - 30 Tage), wobei auch Blut und Schleimbeimengungen im Stuhl häufiger zu finden sind. Bei histologischer Begutachtung der unteren Dickdarmabschnitte und des Rektums findet man ödematöse Areale, die infolge CPE verursachter Läsionen entstanden sind.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Enterotoxin sowohl chromosomal (Lebensmittelvergiftung) als auch episomal (bei AAD und SPOR) codiert sein kann.

Mit dem RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin Test steht neben dem RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B Test ein weiteres wichtiges Nachweissystem zur Aufklärung Antibiotika-assoziiertes und sporadischer Durchfallerkrankungen zur Verfügung. Er ermöglicht eine schnelle und zuverlässige Diagnose und ist insofern hilfreich für die Therapieentscheidung.

3. Testprinzip

Im RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin Test werden monoklonale Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind monoklonale Antikörper gegen Epitope des Enterotoxins von *C. perfringens* gebunden. Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe sowie die Kontrollen werden zusammen mit biotinylierten Anti-Enterotoxin - Antikörpern (Konjugat 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) zur Inkubation in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einem Waschschrift wird Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat (Konjugat 2) dazu gegeben und erneut bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert. Bei Anwesenheit des Enterotoxins in der Probe bildet sich ein Sandwich-Komplex aus immobilisierten Antikörpern, Enterotoxin und konjugierten Antikörpern. Nicht gebundenes Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration des in der Probe vorhandenen CPE.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen

Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte, 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Enterotoxin von <i>Clostridium perfringens</i>
Diluent 1	100 ml	Probenverdünnungspuffer, Protein-gepufferte NaCl-Lösung; gebrauchsfertig; blau gefärbt
Wash	100 ml	Waschpuffer, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (10fach konz.); enthält 0,1% Thimerosal
Control +	2 ml	Positivkontrolle; inaktiviertes Enterotoxin; gebrauchsfertig
Control -	2 ml	Negativkontrolle (Probenverdünnungspuffer); gebrauchsfertig
Conjugate 1	13 ml	Biotin-konjugierte Antikörper gegen Enterotoxin in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; blau gefärbt
Conjugate 2	13 ml	Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; orange gefärbt
Substrate	13 ml	Wasserstoffperoxid/TMB; gebrauchsfertig
Stop	12 ml	Stopp-Reagenz; 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C 4 Wochen haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfalldatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

6.1. Reagenzien

- Destilliertes oder de-ionisiertes Wasser

6.2. Zubehör

- Probenröhrchen
- Einwegpipetten (Art. Nr.: Z0001)
- Vortex Mixer (optional, siehe 9.3.)
- Mikropipette für 50 – 100 µl und 1 ml Volumina
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 620 - 650 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Proben persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die

Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Weitere Details siehe Material Safety Data Sheets (MSDS) www.r-biopharm.com.

Die im Kit befindliche Positiv-Kontrolle enthält inaktiviertes Enterotoxin. Sie sollte, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Der Waschpuffer enthält als Konservierungsmittel 0,1% Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Das Untersuchungsmaterial ist bis zur Verarbeitung bei 2 - 8 °C zu lagern. Kann das Material nicht innerhalb von 3 Tagen im Test eingesetzt werden, wird eine Lagerung bei -20 °C oder kälter empfohlen. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. Eine im Probenverdünnungspuffer 1:11 verdünnte Stuhlprobe ist bei 4 °C bis zu 7 Tagen haltbar.

Stuhlproben oder Rektalabstriche sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transportmedien mit Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metallionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit dem

RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin Test auftreten können. Stuhlproben, die sich in handelsüblichen Transportmedien (Cary Blair, Amies) befinden, können im RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin Test verwendet werden. Dabei muss jedoch die dadurch bedingte Vorverdünnung der Probe berücksichtigt werden. Die Endverdünnung der Stuhlprobe im Diluent 1 soll möglichst genau bei 1:11 liegen.

Wenn rektale Abstriche eingesetzt werden sollen, ist darauf zu achten, dass genügend Stuhlmaterial (ca. 100 mg) zur Testdurchführung vorhanden ist.

Bei Umgebungsuntersuchungen sollten auch Stuhlproben von klinisch unauffälligen Kontaktpersonen genommen werden, um asymptomatische Träger zu identifizieren.

9. Testdurchführung

9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte Plate auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch sind die Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Beutel) und die Reagenzien wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wieder

verwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind.

Ein direkter Kontakt von Proben mit den Kitkomponenten ist zur Vermeidung von Kreuzkontamination zu vermeiden.

Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung sollte vermieden werden. Es wird empfohlen, die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten abzudecken oder abzukleben.

9.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates **Wash** wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Eventuell die im Konzentrat vorhandenen Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

9.3. Vorbereitung der Proben

In ein gekennzeichnetes Teströhrchen werden 1 ml RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent | 1** vorgelegt. Flüssiger Stuhl wird in eine Einwegpipette (Art. Nr. Z0001) bis kurz oberhalb der zweiten Verdickung aufgesaugt (100 µl) und im vorgelegten Puffer suspendiert. Bei festem Stuhl wird eine äquivalente Menge Stuhl (100 mg) mit einem Spatel oder einer Einmal-Impföse entnommen und suspendiert.

Das Homogenisieren der Stuhlsuspension erfolgt entweder durch Aufsaugen und Ausstoßen mit der Einwegpipette oder alternativ durch Mischen auf einem Vortex Mixer. Nach kurzem Stehenlassen zur Sedimentation grober Stuhlpartikel kann der auf diese Weise geklärte Überstand der Stuhlsuspension direkt im Test eingesetzt werden. Erfolgt die Testdurchführung in einem ELISA-Automaten muss dieser Überstand partikelfrei sein. In diesem Fall empfiehlt sich eine Zentrifugation bei 2500 G für 5 Minuten.

Hinweis:

Die im **Diluent | 1** verdünnten Stuhlproben können auch in allen anderen RIDASCREEN® Testen eingesetzt werden, die ebenfalls das **Diluent | 1** verwenden.

9.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden 100 µl der Positiv-Kontrolle **Control | +**, der Negativkontrolle **Control | -** oder der Stuhlprobensuspension in die Vertiefungen pipettiert. Anschließend werden 100 µl des Biotin-konjugierten Antikörpers **Conjugate | 1** zugegeben und nach Durchmischung (leichtes Tippen an den Plattenrand) für 60 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

9.5. Waschen

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zur Erzielung korrekter Ergebnisse und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter entleert und gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgt werden. Danach wird die Platte auf

saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

Bei der Verwendung von Waschautomaten oder ELISA-Automaten ist die korrekte Einstellung des Gerätes zu beachten bzw. beim Hersteller zu erfragen.

Geräte, die R-Biopharm liefert, sind bereits mit validierten Einstellungen und Arbeitsprotokollen programmiert. Um Verstopfungen von Waschnadeln zu vermeiden sollten gemäß der Probenvorbereitung (Pkt. 9.3.) nur partikelfreie Stuhlsuspension eingesetzt werden. Bei den Waschschrritten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden.

9.6. Zweite Inkubation

100 µl des Poly-Streptavidin-Peroxidase-Konjugates **Conjugate | 2** werden in die Kavitäten pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

9.7. Waschen

Waschen gemäß Pkt. 9.5.

9.8. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **Substrate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm gemessen (optional: 450/620 nm). Der Abgleich des Nullwertes sollte gegen Luft - also ohne Mikrotiterplatte - erfolgen.

Hinweis:

Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Substrates verursachen.

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv- und Negativ-Kontrolle mitzuführen, um Reagenzien-Stabilität und korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (O.D.) der Negativ-Kontrolle bei 450 nm kleiner 0,2 (bei 450/620 kleiner 0,160) und der gemessene Wert der Positiv-Kontrolle bei 450 nm oder 450/620 nm größer 0,8 ist. Ist der Wert der Negativkontrolle größer 0,2 (0,160) kann dies ein Zeichen für ungenügendes Waschen sein. Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläuliche verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm Distributor.

11. Auswertung und Interpretation

11.1. Berechnung des Grenzwertes

Zur Festlegung des Grenzwertes werden zu der gemessenen Extinktion der Negativkontrolle 0,15 Extinktionseinheiten hinzuaddiert.

$$\text{Cut-off} = \text{Extinktionswert der Negativkontrolle} + 0,15$$

11.2. Testergebnis

Als positiv werden solche Proben beurteilt, deren Extinktionswert mehr als 10 % über dem errechneten Grenzwert liegt.

Als grenzwertig und zu wiederholen werden solche Proben bezeichnet, deren Extinktionswert im Bereich von 10 % oberhalb und unterhalb des Grenzwertes liegt. Fällt eine Wiederholungsuntersuchung mit einer frischen Stuhlprobe wieder in den Graubereich, so ist die Probe als negativ zu beurteilen.

Proben, die mehr als 10 % unter dem errechneten Grenzwert liegen, sind als negativ zu bewerten.

12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin Test weist Enterotoxin von *Clostridium perfringens* in Stuhlproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus.

Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche Infektion mit *Clostridium perfringens* nicht aus. Es kann durch proteolytischen Abbau der Enterotoxine bei unsachgemäßer Lagerung der Probe

verursacht sein. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Infektion mit *Clostridium perfringens* sollte eine weitere Stuhlprobe untersucht werden.

Ein grenzwertiges Ergebnis kann durch eine inhomogene Verteilung der Toxine in der Stuhlprobe verursacht werden. Deshalb sollte in einem solchen Fall eine zweite Suspension aus der gleichen Probe untersucht werden oder eine weitere Stuhlprobe zur Untersuchung angefordert werden.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Methodenvergleich zur Nachweisgrenze

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wurde eine Enterotoxin-Stammlösung (10 µg/ml) in dem jeweiligen Probenverdünnungspuffer titriert und im RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin Test und einem kommerziell verfügbaren Konkurrenz ELISA eingesetzt. In Tabelle 1 sind die Konzentrationen an Toxin, und die jeweiligen ELISA-Bewertungen dargestellt.

Tab1: Vergleich zweier ELISA zum Nachweis von *Clostridium perfringens* Enterotoxin.

CPE (ng/ml)	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	0,019
RIDASCREEN®	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
anderer ELISA	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Der RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin ELISA kann 0,04 ng/ml reines Enterotoxin detektieren und ist damit um den Faktor 60 sensitiver als der kommerziell verfügbare ELISA des Mitbewerbers.

13.2. Kreuzreaktivität

Verschiedene pathogene Keime des Intestinaltraktes wurden mit dem RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin ELISA untersucht und zeigten keine Kreuzreaktivität. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit Bakteriensuspensionen (10^6 bis 10^9 cfu/ml), mit Parasitenkulturen (10^7 bis 10^9 Organismen/ml) und mit Zellkulturüberständen virusinfizierter Zellen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgelistet.

Tab.2 : Kreuzreaktionen mit pathogenen Keimen des Intestinaltraktes

Testkeim	Ergebnis [OD 450 nm]
Adenovirus	0.050
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.046
<i>Bacillus cereus</i>	0.054
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.053
<i>Campylobacter coli</i>	0.060
<i>Campylobacter fetus</i>	0.055
<i>Campylobacter jejuni</i>	0.053

<i>Campylobacter lari</i>	0.060
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	0.051
<i>Candida albicans</i>	0.052
<i>Citrobacter freundii</i>	0.052
<i>Clostridium bifermentans</i>	0.044
<i>Clostridium difficile</i>	0.044
<i>Clostridium novyi</i>	0.049
<i>Clostridium perfringens</i>	0.046
<i>Clostridium septicum</i>	0.050
<i>Clostridium sordellii</i>	0.049
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.060
<i>Cryptosporidium parvum</i>	0.053
<i>E. coli</i> (O26:H-))	0.049
<i>E. coli</i> (O6)	0.045
<i>E. coli</i> (O157:H7)	0.044
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.051
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.050
<i>Giardia lamblia</i>	0.052
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.046
<i>Proteus vulgaris</i>	0.046
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.051
Rotavirus	0.080
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.044
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.045
<i>Serratia liquefaciens</i>	0.044
<i>Shigella flexneri</i>	0.043
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.054
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.043
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.044
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.046

13.3. Präzision

Die Reproduzierbarkeit des RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin Test wurde mit sechs Referenzen durchgeführt, die den gesamten Messbereich von negativ bis hoch positiv abdecken. Zur Bestimmung der Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurden 40 Replikate dieser Referenzen gemessen. Die Mittelwerte und die Variationskoeffizienten (VK) wurden für 3 Kit Lots ermittelt. Für die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurden die Referenzen an 10 aufeinanderfolgenden Arbeitstagen mit 2 Läufen am Tag in Duplikaten gemessen. Die Messungen wurden mit 3 Kit Lots und von 2 Technikern durchgeführt. Die Inter-Lot Reproduzierbarkeit wurde über alle 3 Kit Lots ermittelt.

Referenz Mittelwert / VK	Intra-Assay			Inter-Assay			Inter-Lot
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	1.966 / 7.55%	1.941 / 5.38%	1.882 / 6.66%	2.199 / 13.16%	1.917 / 12.10%	1.735 / 12.11%	1.951 / 17.21%
2	0.948 / 5.40%	0.927 / 7.37%	0.813 / 7.77%	1.114 / 14.72%	0.966 / 11.98%	0.843 / 14.31%	0.974 / 19.46%
3	0.494 / 9.34%	0.484 / 7.56%	0.459 / 6.20%	0.551 / 13.55%	0.495 / 11.04%	0.416 / 15.15%	0.487 / 19.09%
4	0.361 / 9.94%	0.405 / 8.33%	0.320 / 6.43%	0.423 / 23.05%	0.382 / 13.94%	0.322 / 15.50%	0.376 / 22.79%
5	0.184 / 11.44%	0.197 / 5.88%	0.143 / 11.60%	0.199 / 16.92%	0.183 / 14.92%	0.143 / 15.20%	0.175 / 22.55%
6	0.046 / 8.79%	0.054 / 6.69%	0.048 / 17.25%	0.054 / 20.07%	0.053 / 16.00%	0.050 / 7.88%	0.052 / 15.68%

14. Interferierende Substanzen

Die nachfolgend aufgeführten Substanzen zeigten keinen Effekt auf die Testergebnisse, wenn sie in *Clostridium perfringens* Enterotoxin-positive und *Clostridium perfringens* Enterotoxin-negative Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen eingemischt wurden: Bariumsulfat (5 % w/w), Loperamid (Antidiarrhoikum; 5 % w/w), Pepto-Bismol (Antidiarrhoikum; 5 % v/w), Muzin (5 % w/w), Cyclamat (künstlicher Süßstoff 5 % v/w), Humanblut (5 % v/w), Stearinsäure/Palmitinsäure (Mischung 1:1, 40 % w/w), Metronidazol (0.5) (Antibiotikum 5 % v/w), Diclofenac (0.00263 % v/w).

Anhang

Testspezifische Symbole :

Plate	Mikrotiterplatte
Diluent 1	Probenverdünnungspuffer
Wash	Waschpuffer
Control +	Positivkontrolle
Control -	Negativkontrolle
Conjugate 1	Konjugat 1
Conjugate 2	Konjugat 2
Substrate	Substrat
Stop	Stopp-Reagenz

Literatur

1. Collie, Renee E. McClane, Bruce A.: Evidence That the Enterotoxin Gene Can Be Episomal in *Clostridium perfringens* Isolates Associated with Non-Food-Borne Human Gastrointestinal Diseases. *J. Clin. Microbiol.* 36 No. 1, 30-36 (1998)
2. Collie, Renee E. et al. Phenotypic Characterization of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* Isolates from Non-foodborne Human Gastrointestinal Diseases. *Anaerobe*, No. 4, 69-79 (1998)
3. Borriello, S.P. Newly described clostridial diseases of the gastrointestinal tract: *Clostridium perfringens* enterotoxin-associated diarrhea and neutropenic due to *Clostridium septicum*. In Borriello S.P. (eds.) *Clostridia in Gastrointestinal Disease*, pp 223-228, CRC Press, Inc., Boca Raton (1985)
4. Borriello, S.P. et al.: Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic-associated diarrhea. *Lancet* 1, 305-307 (1984)
5. Brett, M.M. et al. Detection of *Clostridium perfringens* and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhea. *J. Clin. Pathol.* 45, 609-611 (1992)
6. Jackson, S. et al.: Diagnostic importance of *Clostridium perfringens* enterotoxin analysis in recurring enteritis among the elderly, chronic care psychiatric patients. *J. Clin. Microbiol* 23, 748-751 (1986)
7. Mpamugo, O. et al. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*, as a cause of sporadic cases of diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 43, 442-445 (1995)
8. Borriello, S.P. Clostridial Disease of the Gut. *Clin. Infect. Dis., Suppl 2*; 242-250 (1995)
9. Rood, Julian I. Virulence Genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 333-360 (1998)
10. Sakurai, Jun et al. Major Toxins of *Clostridium perfringens*. *J. Toxicol. – Toxin Reviews.* 16(4), 195-214 (1997)
11. Titball, Richard W. et al. The *Clostridium perfringens* α -toxin. *Anaerobe* 5, 51-64 (1999)
12. Wnek, Andrew P. et al. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against *Clostridium perfringens* Type A Enterotoxin. *Infection and Immunity.* Vol. 50, No. 2., 442-448 (1985)
13. Hanna, Philip C. et al. Mapping of Functional Regions of *Clostridium perfringens* Type A Enterotoxin. *Infection and Immunity.* Vol. 60, No. 5, 2110-2114 (1992)
14. Brockmann, S. Gastroenteritis-Ausbruch verursacht durch *Clostridium perfringens*. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 18, 145-146 (2000)
15. Graf, P. Gastroenteritis-Ausbruch verursacht durch *Clostridium perfringens*; Robert Koch-Institut; *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 41, 327-329 (2000)