

Clostridium Perfringens Enterotoxin Test

An ELISA for detecting
Clostridium perfringens enterotoxin in fecal specimens
Catalog No. T5006V (96 Tests)

ESPAÑOL p. 6
Una prueba de ELISA para detectar la enterotoxina de
Clostridium perfringens en muestras fecales
No. De catálogo T5006V (96 Pruebas)

DEUTSCH p. 10
Ein ELISA-Testverfahren zum Nachweis von
Clostridium perfringens Enterotoxin in Stuhlproben
Katalognummer T5006V (96 Tests)

FRANCAISE p. 15
Un ELISA pour détecter l'entérotoxine de
Clostridium perfringens dans les spécimens fécaux
Numéro de Catalogue T5006V (96 Analyses)

Developed and Manufactured by



TECHLAB®

Blacksburg, VA 24060
U.S. only, 1-800-TECHLAB
TEL.: (540) 953-1664 FAX: (540) 953-1665



International Symbol Key:

REF Catalog Number

IVD *In Vitro* Diagnostic Medical Device

LOT Lot Information

Contains sufficient reagents
for <n> tests

Temperature Limitation

Use By/Expiration Date

CE Symbol

Caution, consult
accompanying documents

C. perfringens Enterotoxin Test

INTENDED USE

The *Clostridium perfringens* Enterotoxin Test is an enzyme immunoassay for the rapid detection of enterotoxin produced by *Clostridium perfringens*. It can be used to detect enterotoxin in fecal specimens from persons suspected of having *C. perfringens* disease. The test is to be used as an aid in the diagnosis of *C. perfringens* enterotoxin-associated disease and results should be considered in conjunction with the patient history. FOR INVESTIGATIONAL USE ONLY. The performance characteristics of this product have not been established.

EXPLANATION

Intestinal disease caused by *C. perfringens* enterotoxin is the result of food poisoning following the consumption of contaminated, precooked food which has been inadequately stored or reheated. The disease was first reported at the turn of the last century and has become increasingly well characterized since the mid-1940s. Diarrhea and abdominal cramps are typical features, whereas vomiting and death are uncommon. Symptoms appear from 12 to 24 hours after the suspect meal is eaten and last for about 24 hours. During food poisoning, the organism is consumed, sporulation takes place in the gut, enterotoxin is released, and disease follows. Enterotoxin is the product of the *cpe* gene and the two bacterial phenotypes are designated Ent+ and Ent-. Clearly, since most Ent- strains tested can sporulate, enterotoxin production is not a prerequisite for spore formation. However, although some enterotoxin is formed during exponential growth, the transcriptional factors activating the sporulation genes also up-regulate the *cpe* gene and maximum levels of enterotoxin occur during sporulation. Food poisoning as well as the molecular genetics and pathogenesis of *C. perfringens* enterotoxin have been well reviewed by Rood and Cole (1) and Stringer (2).

Even in the absence of typical food poisoning, *C. perfringens* enterotoxin can be produced *in vivo*, resulting in diarrhea. Following disruption of the normal intestinal microflora by agents such as antibiotics, clostridia can colonize the vacated ecological niches within the bowel. (*Clostridium difficile* and *Clostridium spiroforme* both infect susceptible hosts in this way.) In one study of *C. perfringens* diarrheas (3), 60% were antibiotic-associated. Just as the symptoms of foodborne botulism differ from those seen in infants with *in vivo* intoxication, the clinical features of *C. perfringens* food poisoning and antibiotic-associated disease also differ. In the latter, diarrhea lasts on average 10 days, fecal blood and mucus are common and relapses may occur.

PRINCIPLE OF THE TEST

The *Clostridium perfringens* Enterotoxin Test uses two antibodies to *C. perfringens* enterotoxin. The microassay wells supplied with the kit contain immobilized polyclonal antibody against *C. perfringens* enterotoxin. The *Conjugate* consists of polyclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase. In the assay, an aliquot of a fecal specimen is emulsified in the *Diluent* and the diluted specimen is then transferred to the microassay well. If enterotoxin is present in the specimen, it will bind to the immobilized polyclonal antibody and conjugate during the 2-hour incubation phase. Any unbound material is removed during the washing steps. Following the addition of *Substrate*, a color is detected due to the enzyme-antibody-antigen complexes that form in the presence of enterotoxin.

MATERIALS PROVIDED

- | | |
|-------------|---|
| DIL SPE | Diluent , 40 mL (buffered protein solution + 0.02% thimerosal). The <i>Diluent</i> is also to be used as the negative control solution (see TEST PROCEDURE). |
| CONJ ENZ | Conjugate , 7 mL (polyclonal antibody specific for enterotoxin coupled to horseradish peroxidase - in a buffered protein solution + 0.02% thimerosal). |
| SUBS REAG | Substrate , 14 mL (buffered solution containing tetramethylbenzidine and peroxide). |
| CONTROL + | Positive Control Reagent , 3.5 mL (enterotoxin in a buffered protein solution containing 0.02% thimerosal). |

WASHBUF 20X **Wash Buffer Concentrate**, 50 mL (20X concentrate containing phosphate-buffered saline, detergent and 0.2% thimerosal).

H₂SO₄ 0.6N **Stop Solution**, 7 mL (0.6 N sulfuric acid). **CAUTION: Avoid contact with skin.** Flush with water immediately if contact occurs.

MA **PLT** **12 Assay Well Strips**, each consisting of 8 wells coated with polyclonal antibody specific for enterotoxin (stored with desiccant).

ACCESSORIES

100 disposable plastic pipettes 2 plastic adhesive sheets 50 applicator sticks

MATERIALS NOT PROVIDED

Squirt bottle for *Wash Solution* 950 mL distilled water for diluting *Wash Solution*

Incubator set at 37°C ± 2°C

ELISA reader capable of reading dual wavelength at 450/620 nm or 450/550 nm, or single wavelength at 450 nm (a dual wavelength plate reader is recommended; absorbances should be measure at 450 nm and referenced at 620 nm or 550 nm)

Discard container and absorbent paper (e.g., paper towels)

Refrigerator for storage of kit and specimens (set between 2° and 8°C)

Tubes for dilutions Vortex mixer

PRECAUTIONS

1. Reagents from different kits should not be mixed. Do not use kit past the expiration date.
2. Reagents should be at room temperature before use.
3. Caps and tips are color coded; do not mix!
4. When handling assay wells, avoid scratching the bottom of the wells because this may result in elevated absorbance readings.
5. Hold dropper bottles vertically to ensure proper drop size.
6. Microassay wells should be handled and disposed of as potential biohazards after use. Wear gloves when doing the test.
7. Reagents contain 0.02% thimerosal as a preservative and should be handled with normal laboratory caution.
8. The *Stop Solution* contains 0.6 N sulfuric acid. Flush with water immediately if contact occurs.
9. Unused microassay wells must be placed back inside of the resealable bag with the desiccant to protect them from moisture.
10. Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions.
11. The *Substrate* is light sensitive and should be protected from direct sunlight or UV sources.

COLLECTION AND HANDLING OF FECAL SPECIMENS

NOTE: Standard collection and handling procedures used in-house for fecal specimens are appropriate. Specimens should be transported and diluted in kit *Diluent* as soon as possible. Diluted specimens should be stored between 2° and 8°C. Whenever possible, test samples which are less than 24 hours old. Refrigeration of pre-diluted samples is an effective way to reduce loss of ELISA reactivity for up to 7 days; this does not work for all fecal specimens (4). Freezing and thawing of the specimen, especially multiple times, may result in loss of activity due to degradation of the toxin. Make sure that specimens are thoroughly mixed prior to performing the assay. This includes complete mixing (vortexing) of the specimen prior to transfer to *Diluent* as well as complete mixing of the diluted specimen prior to transfer to the assay well. The *Diluent* has been formulated to stabilize the toxin in fecal specimens and minimize degradation. Disposable pipettes, which are included, are graduated at 50, 100, 200, and 300 µL.

1. Set up one dilution tube for each specimen to be tested. Add 200 µL *Diluent* to each tube. *Label the tube directly on the side.*
2. For **liquid fecal specimens**, use a plastic pipette to transfer 50 µL of specimen to the tube. Make sure the liquid specimens are evenly suspended before transferring.

- For **formed fecal specimens (solid specimens from persons without diarrhea are normally an inappropriate sample)**, use an applicator stick to transfer the fecal specimen to the tube. Transfer an amount equal to about 3 mm in diameter with the applicator stick to the *Diluent*.
- Vortex the tubes for 10 seconds and store between 2° and 8°C until the ELISA is performed. Vortex again before transferring diluted specimen to microassay well. This ensures thorough mixing of the specimen.

PRELIMINARY PREPARATIONS

- IMPORTANT** - All reagents must be at room temperature prior to use in the assay.
- Prepare the *1X Wash Solution*. The *Wash Buffer Concentrate* is supplied as a 20X concentrate (a precipitate may be noticed). It should be diluted to a total volume of 1 liter by adding 50 mL of the concentrate to 950 mL of distilled water. Label the bottle. Store any unused *1X Wash Solution* between 2° and 8°C.
- Assay Strip Preparation. Each strip contains 8 wells coated with affinity purified polyclonal antibody specific for *C. perfringens* enterotoxin. Each specimen or control will employ one of these coated wells. Determine the number of wells to be used. Assay wells not used must be returned to the plastic bag and carefully resealed with desiccant.

TEST PROCEDURE

- Add one drop (50 µL) of *Conjugate* (red cap) to each well. Be sure to hold each bottle vertically when adding the drops. Use 1 well for each fecal specimen, 1 well for the *Positive Control*, and 1 well for the *Negative Control* (i.e., *Diluent*). Identification marks may be written directly on the side of the well.
- Transfer 100 µL (2 drops using a disposable pipette provided) of diluted specimen to the assay well. Add 1 drop (50 µL) of the *Positive Control Reagent* (black cap) to the positive control well and 50 µL (1 drop using a disposable pipette provided) of the negative control (i.e., *Diluent*) to the negative control well.
- Cut the adhesive plastic sheet to the size necessary to cover the wells. Cover the wells and incubate them at 37°C ± 2°C for 2 hours.
- Shake out the contents of the assay wells into a discard pan.
- Wash each well using the *1X Wash Solution* in squirt bottle with a fine-tipped nozzle, directing the *Wash Solution* to the bottom of the well with force. Fill the wells, then shake the *Wash Solution* out of the well into a discard pan. Slap the inverted plate on a dry paper towel and repeat steps #4 and #5 **four times** using a dry paper towel each time. If any particulate matter is seen in the wells, continue washing until all the particulate matter is removed.
- After washing, completely remove any residual liquid in the wells by striking the plate once again onto a dry paper towel until no liquid comes out. *Dispose of paper towels and specimen containers properly.*
- Add 2 drops (100 µL) of *Substrate* (blue cap) to each well. Incubate the wells at room temperature for 15 minutes.
- Add 1 drop (50 µL) of *Stop Solution* (yellow cap) to each well. Gently tap the wells and wait 2 minutes before reading. The addition of the *Stop Solution* converts the blue color to a yellow color which may be quantitated by measuring the optical density at 450 nm on a microplate ELISA reader (reference 620 or 550 nm on dual wavelength reader). The instrument should be blanked against air. Wipe the underside of each well before measuring the optical density. If an ELISA reader is unavailable, the test may be read visually in good light against a white background. If a dual reader is used, blank against air at 620 or 550 nm and read at 450 nm. Read within ten minutes after adding *Stop Solution*.

QUALITY CONTROL

- A positive and a negative control must be run with each series of test specimens.
- Positive and negative controls must fall in their respective ranges or the test is not valid. If these results are out of range, please call Technical Services.

- a) Positive Control must be a visible yellow color.
If read on a spectrophotometer, the OD_{450} or $OD_{450/620}$ or $OD_{450/550}$ must be ≥ 0.500 .
- b) Negative Control must be visually clear.
If read on a spectrophotometer, the OD_{450} must be < 0.120 ,
or the $OD_{450/620}$ or $OD_{450/550}$ must be < 0.080 .
3. Wells that are clear visually but that give an absorbance ≥ 0.120 should be wiped on the underside and the absorbance should be measured again.
4. Visual readings must be taken in good light against a white background.
5. A sample that yields a weak positive result (i.e., < 0.200) and is adjacent to a strong positive should be repeated to assure carryover did not occur.

INTERPRETATION OF RESULTS

1. Visual Reading

Negative = Colorless

Positive = Any yellow color

2. Spectrophotometric Single Wavelength at 450 nm

Negative = $OD_{450} < 0.120$

Positive = $OD_{450} \geq 0.120$

3. Spectrophotometric Dual Wavelength at 450/620 nm or 450/550 nm

Negative = $OD_{450/620}$ or $OD_{450/550} < 0.080$

Positive = $OD_{450/620}$ or $OD_{450/550} \geq 0.080$

A positive test result indicates that *C. perfringens* enterotoxin is present in the fecal specimen.

SHELF LIFE AND STORAGE

Upon arrival, the kit should be inspected to ensure that the components are not frozen or warm-to-the-touch due to improper shipping conditions. Each component in the kit should be inspected for any signs of leakage. The expiration date of the kit is given on the label. Expiration dates for each component are listed on the individual labels. The kit containing the reagents with designated shelf life should be stored between 2° and 8°C and should be returned to the refrigerator as soon as possible after use.

C. perfringens Enterotoxin Test - ESPAÑOL

INDICACIÓN DE USO

La Prueba para la Enterotoxina de *Clostridium perfringens* es un inmunoensayo enzimático para la detección rápida de la enterotoxina producida por *Clostridium perfringens*. Puede ser utilizada para detectar la enterotoxina en especímenes fecales de personas con sospecha de tener la enfermedad por *C. perfringens*. La prueba debe ser utilizada como una ayuda en el diagnóstico de la enfermedad asociada con la enterotoxina de *C. perfringens* y los resultados deben ser considerados en conjunto con la historia clínica del paciente.

SOLO PARA USO EN INVESTIGACIÓN. Las características de desempeño de este producto no han sido establecidas.

EXPLICACIÓN

La enfermedad intestinal causada por la enterotoxina de *C. perfringens* es el resultado de una intoxicación alimentaria producto de la ingestión de comida pre-cocinada, contaminada, que ha sido almacenada o recalentada en forma inadecuada. La enfermedad fue reportada por primera vez a comienzos del último siglo y ha tenido una mayor y mejor caracterización desde mediados de los 40. Los rasgos típicos de la enfermedad son diarrea y dolor abdominal, mientras que vómitos y muerte son poco comunes. Los síntomas aparecen a partir de las 12 a 24 horas después de ingestión de la comida sospechosa y duran cerca de 24 horas. Durante la intoxicación alimentaria, el microorganismo es consumido, y se produce la esporulación en el intestino, la enterotoxina es liberada, y como consecuencia ocurre la enfermedad. La enterotoxina es el producto del gen *cpe* y los dos fenotipos bacterianos son designados como Ent+ y Ent-. Ya que la mayoría de las cepas Ent- que han sido examinadas pueden esporular, la producción de enterotoxina no es un pre-requisito para la formación de esporas. Sin embargo, aun cuando algo de enterotoxina se forma durante el crecimiento exponencial, los factores de transcripción que activan los genes de la esporulación, también regulan al gen *cpe*, y durante la esporulación se presentan los niveles máximos de enterotoxina. La intoxicación alimentaria junto con la genética molecular y la patogénesis de la enterotoxina de *C. perfringens* han sido compiladas por Rood y Cole (1) y Stringer (2).

Aun en la ausencia de la típica intoxicación alimentaria, la enterotoxina de *C. perfringens* puede ser producida *in vivo*, resultando en diarrea. Como consecuencia de la alteración de la microflora intestinal normal por agentes como los antibióticos, el clostridio puede colonizar nichos ecológicos vacantes dentro del intestino. (Tanto *Clostridium difficile* como *Clostridium spiroforme* pueden infectar a huéspedes susceptibles de esta manera). En un estudio sobre diarreas por *C. perfringens* (3), el 60% estuvieron asociadas con antibióticos. Al igual que como los síntomas del botulismo alimentario difieren de los vistos en infantes con intoxicación *in vivo*, los rasgos clínicos de la intoxicación alimentaria por *C. perfringens* difieren de aquellos de la enfermedad asociada con antibióticos. En éste último caso, la diarrea dura en promedio 10 días, sangre y mucosidad fecal son comunes y pueden presentarse recaídas.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La Prueba de Enterotoxina de *Clostridium perfringens* usa dos anticuerpos contra la enterotoxina de *C. perfringens*. Los pocillos de microensayo incluidos en el kit contienen anticuerpos policlonales inmovilizados dirigidos contra la enterotoxina de *C. perfringens*. El *Conjugado* se compone de anticuerpos policlonales conjugados con peroxidasa de rábano picante. En el ensayo, una alícuota del espécimen fecal es emulsificada con el diluyente y el espécimen diluido es transferido al pocillo de microensayo. Si la enterotoxina está presente en la muestra, esta se unirá al anticuerpo policlonal inmovilizado y al conjugado durante la fase de incubación de 2 horas. Cualquier material no enlazado es eliminado durante los pasos de lavado. A continuación de la adición del sustrato, se detecta color debido a los complejos de enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en presencia de la enterotoxina.

MATERIALES PROVISTOS

DIL SPE	Diluyente , 40 mL (solución de tampón proteica, conteniendo 0.02% de timerosal). El <i>Diluyente</i> también se debe usar como la solución de control negativo (ver PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA).
CONJ ENZ	Conjugado , 7 mL (anticuerpos policlonales específicos contra la enterotoxina conjugados con peroxidasa de rábano picante, en una solución tampón proteica conteniendo 0.02% de timerosal)
SUBS REAG	Substrato , 14 mL (solución tampón proteica conteniendo tetrametilbenzidina y peróxido)
CONTROL +	Reactivo Control Positivo , 3.5 mL (enterotoxina en una solución tampón proteica conteniendo 0.02% de timerosal)
WASHBUF 20X	Tampón de Lavado Concentrado (20X) , 50 mL (concentrado de 20X que contiene una solución tampón proteica, detergente y 0.2% de timerosal)
H ₂ SO ₄ 0.6N	Solución de Parada , 7 mL (ácido sulfúrico 0.6N). PRECAUCIÓN: Evite el contacto con la piel. Si ocurre contacto, lave inmediatamente con agua.
MA PLT	12 Tiras de Pocillos de Ensayo , cada una consta de 8 pocillos recubiertos con anticuerpos policlonales específicos contra la enterotoxina (almacenados con desecante).

ACCESORIOS

100 pipetas plásticas desechables 2 hojas plásticas adhesivas
50 Palillos aplicadores

MATERIALES NO INCLUIDOS

Piceta para la *Solución de lavado* Tubos para diluciones
950mL de agua destilada para diluir la *Solución de lavado*
Incubadora fija a 37° C ± 2°C Mezclador Vórtex
Espectrofotómetro de doble haz, capaz de leer en longitud de onda dual a 450/620 nm o 450/550 nm, o a una longitud de onda única a 450 nm (se recomienda un lector de doble haz; las absorbancias deben ser medidas a 450 nm y referidas a 620 nm o 550 nm)
Contenedor de desechos y papel absorbente
Refrigerador para almacenar del kit y los especímenes (en un rango entre 2° y 8°C)

PRECAUCIONES

- No se deben mezclar los reactivos de distintos kits. No use el kit pasada de su fecha de expiración.
- Lleve todos los reactivos a temperatura ambiente antes de usarlos.
- Las puntas y tapas están codificadas por color; ¡no los mezcle!
- Cuando maneje los pocillos de ensayo, evite raspar el fondo de estos porque puede resultar en lecturas de absorbancia elevadas.
- Sostenga los viales goteros en forma vertical para asegurar el tamaño de gota apropiado.
- Los pocillos de microensayo deben ser manejados y desechados como potenciales riesgos biológicos. Cuando realice la prueba use guantes desechables.
- Los reactivos contienen 0.02% de timerosal como preservante y deben ser manejados con la precaución normal de laboratorio.
- La *Solución de Parada* contiene ácido sulfúrico 0.6 N. Si ocurre contacto, lave inmediatamente con agua.
- Los pocillos de ensayo sin utilizar deben ser guardados dentro de la bolsa resellable, con desecante para protegerlos de la humedad.
- Realice el procedimiento de lavado tal y como se indica para evitar altas reacciones de fondo.
- El *Substrato* es sensible a la luz y debe protegerse de la luz solar directa o de fuentes de radiación UV.

RECOLECCIÓN Y MANEJO DE ESPECÍMENES FECALES.

NOTA: Los procedimientos estándares de laboratorio para la recolección y manejo de muestras fecales son apropiados. Los especímenes deben ser transportados y diluidos en

el *Diluyente* del kit tan pronto como sea posible. Los especímenes diluidos deben ser almacenados entre 2° y 8°C. Cuando sea posible, realice la prueba con muestras que tienen menos de 24 horas desde su recolección. Una forma efectiva de reducir la pérdida de actividad en la prueba de ELISA es refrigerar las muestras pre-diluidas por hasta 7 días; esto no funciona con todas las muestras fecales (4). La congelación y descongelación de las muestras, especialmente en múltiples ocasiones, pueden resultar en la pérdida de actividad debido a la degradación de la toxina. Asegúrese de que los especímenes estén completamente mezclados antes de ejecutar el ensayo. Esto incluye un mezclado completo (vórtex) del espécimen antes de transferirlo al *Diluyente*, al igual que se debe realizar un mezclado completo del espécimen diluido antes de transferirlo a los pocillos de ensayo. El *Diluyente* ha sido formulado para estabilizar a la toxina en especímenes fecales y minimizar su degradación. Las pipetas desechables, que están incluidas, están graduadas a 50, 100, 200 y 300 µL.

1. Prepare un tubo de dilución por cada muestra a examinar. Añada 200 µL de *Diluyente* a cada tubo. *Etiquete el tubo por un costado.*
2. Para **especímenes fecales líquidos**, use una pipeta plástica para transferir 50 µL del espécimen al tubo. Asegúrese que los especímenes líquidos estén uniformemente suspendidos antes de transferirlos.
Para **especímenes fecales formadas (por lo general, no son apropiadas los especímenes fecales sólidas de personas sin diarrea)**, use un palillo aplicador para transferir el espécimen fecal al tubo. Transfiera una cantidad aproximadamente igual a 3mm en diámetro con el palillo aplicador al *Diluyente*.
3. Mezcle los tubos con vórtex por 10 segundos y almacénelos entre 2° y 8°C hasta la ejecución de la prueba de ELISA. Agite (vórtex) de nuevo antes de transferir el espécimen diluido al pocillo de microensayo. Esto asegura una mezcla completa del espécimen.

PREPARACIONES PRELIMINARES

1. IMPORTANTE - Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente antes de usarse.
2. Prepare la *Solución de Lavado 1X*. El *Tampon de Lavado Concentrado* está proporcionado como un concentrado al 20X (se puede observar un precipitado). Se debe diluir hasta aforar a un volumen de 1 litro mediante la adición de 50 mL del concentrado a 950 mL de agua destilada. Etiquete la botella. Almacene la *Solución de Lavado 1X* restante sin utilizar entre 2° y 8°C.
3. Prepare los pocillos de microtitulación. Cada tira contiene 8 pocillos recubiertos con anticuerpos policlonales purificados específicos contra la enterotoxina de *C. perfringens*. Cada muestra o cada control requerirá uno de estos pocillos recubiertos. Determine el número de pocillos a usar. Los pocillos no usados deben ser regresados a la bolsa plástica y cuidadosamente resellados con desecante.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Añada 1 gota (50 µL) de *Conjugado* (tapa roja) a cada pocillo. Asegúrese de sostener el gotero en forma vertical cuando añada las gotas. Use un pozo para cada espécimen fecal, un pocillo para el Control Positivo y uno para el Control Negativo (*Diluyente*). Pueden escribirse marcas de identificación directamente por un costado del pocillo.
2. Transfiera 100 µL del espécimen diluido al pocillo de ensayo (2 gotas usando una de las pipetas desechables proporcionadas). Añada 1 gota (50 µL) del *Reactivo Control Positivo* (tapa negra) al pocillo del control positivo y 50 µL del control negativo (*Diluyente*) al pocillo del control negativo (1 gota usando una de las pipetas desechables de los accesorios del kit).
3. Corte las hojas plásticas adhesivas al tamaño necesario para cubrir los pocillos. Cubra los pocillos e incúbelos a 37°C + 2°C por 2 horas.
4. Elimine los contenidos de los pocillos de ensayo por inversión rápida dentro de un recipiente de desechos.
5. Lave cada pocillo con la *Solución de Lavado 1X* usando la piceta con punta fina, dirigiendo con fuerza la *Solución de Lavado* al fondo del pocillo. Llene los pocillos, luego elimine la *Solución de Lavado* de los pocillos, por inversión rápida al recipiente

de desecho. Coloque la placa invertida sobre un papel absorbente seco y repita los pasos de lavado #4 y #5 **cuatro veces** usando un papel seco cada vez. Si se observa material particulado dentro de los pocillos, continúe lavando hasta que este sea eliminado.

- Después del lavado, elimine completamente cualquier líquido residual dentro de los pocillos golpeando la placa invertida sobre papel absorbente hasta que no salga líquido. *Deseche el papel y los contenedores de muestras en forma apropiada.*
- Añada 2 gotas (100 μL) del *Substrato* (tapa azul) a cada pocillo. Incube los pocillos a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Agregue 1 gota (50 μL) de la *Solución de Parada* (tapa amarilla) a cada pocillo. La adición de la *Solución de Parada* convierte el color azul en color amarillo que puede ser cuantificado mediante la medición de la densidad óptica a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA (referencia 620 nm o 550 nm en un lector de doble haz). En el instrumento se debe ajustar el blanco con aire. Limpie el fondo de cada pocillo antes de medir la densidad óptica. Si no se cuenta con un lector ELISA, el examen puede ser leído en forma visual con buena luz contra un fondo blanco. Si se utiliza un lector de doble haz, realice el blanco con aire a 620 o 550 nm y lea a 450 nm. Lea dentro de los diez minutos siguientes a la adición de la *Solución de Parada*.

CONTROL DE CALIDAD

- Se debe correr un control positivo y uno negativo con cada serie de muestras de prueba.
- Los controles positivos y negativos deben caer en sus respectivos rangos o la prueba no será válida. Si los resultados están fuera de rango, por favor llame al Servicio Técnico.
 - El pocillo de Control Positivo debe dar un visible color amarillo. Si se lee en un espectrofotómetro, la DO_{450} o $DO_{450/620}$ o $DO_{450/550}$ debe ser ≥ 0.500 .
 - El Control Negativo debe ser visualmente transparente. Si se lee en un espectrofotómetro, la DO_{450} debe ser < 0.120 , o la $DO_{450/620}$ o $DO_{450/550}$ debe ser < 0.080 .
- A los pocillos que son visualmente transparentes pero que dan absorbancia ≥ 0.120 se les debe limpiar el fondo y deben ser leídos nuevamente.
- Las lecturas visuales deben ser tomadas con buena luz contra un fondo blanco.
- Una muestra que arroja un resultado débil positivo (p. e. < 0.200) y está junto a un pozo positivo intenso debe ser repetida para asegurarse que no ocurrió un traspaso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. Interpretación Visual

Negativa = Transparente

Positiva = Cualquier color amarillo

2. Longitud de Onda Única Espectrofotómetro a 450 nm

Negativa = $DO_{450} < 0.120$

Positiva = $DO_{450} \geq 0.120$

3. Longitud de Onda Dual Espectrofotómetro a 450/620 nm o 450/550nm

Negativa = $DO_{450/620}$ o $DO_{450/550} < 0.080$

Positiva = $DO_{450/620}$ o $DO_{450/550} \geq 0.080$

Un resultado positivo indica que la enterotoxina de *C. perfringens* está presente en el espécimen fecal.

VIDA ÚTIL Y ALMACENAJE

Al arribar, el kit debe ser inspeccionado para asegurarse que los componentes no estén congelados o tibios al contacto debido a condiciones de embarque inapropiadas. Cada componente en el kit debe ser inspeccionado por cualquier signo de derrame. La fecha de caducidad del kit está indicada en la etiqueta. Las fechas de expiración para cada componente están listadas en las etiquetas individuales. El kit que contiene reactivos con vida de anaquel designada debe ser almacenado entre 2° a 8°C y deberá ser regresado al refrigerador tan pronto como sea posible después de su uso.

C. perfringens Enterotoxin Test - DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der *Clostridium perfringens* Enterotoxin Test ist eine Enzym-Immuno-Analyse zur schnellen Feststellung von Enterotoxin, das vom *Clostridium perfringens* produziert wird. Der Test kann dazu verwendet werden, Enterotoxin in Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf *C. perfringens* Erkrankung nachzuweisen. Der Test ist nur ein Hilfsmittel für die Diagnose von *C. perfringens* Enterotoxin-bedingter Krankheit und die Resultate sollten im Zusammenhang mit der Krankheitsgeschichte des Patienten interpretiert werden. NUR FÜR UNTERSUCHUNGSZWECKE. Produktmerkmale für das Testverhalten sind noch nicht festgelegt worden.

ERLÄUTERUNGEN

Darmkrankheiten, die durch *C. perfringens* Enterotoxin verursacht werden, sind eine Folge einer Lebensmittelvergiftung nach Verzehr von verdorbenen, vorgekochten Lebensmitteln, die unsachgemäß gelagert oder aufgewärmt wurden. Diese Erkrankung wurde erstmals zur Jahrhundertwende festgestellt und wurde seit Mitte der 40-er Jahre immer besser charakterisiert. Durchfall und abdominale Krämpfe sind typische Merkmale, Erbrechen und Todesfolge sind äußerst selten. Die Symptome treten 12 bis 24 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme auf und halten für ungefähr 24 Stunden an. Bei einer Lebensmittelvergiftung wird der Organismus konsumiert, es kommt zur Sporenbildung im Darm, Enterotoxin wird gebildet und die akute Erkrankung erfolgt. Enterotoxin ist das Produkt des *cpe* Gens und die beiden bakteriellen Phänotypen werden mit Ent+ und Ent- bezeichnet. Da die meisten Ent- Ketten Sporen bilden können, ist die Enterotoxin-Produktion nicht unbedingt notwendig für die Sporenbildung. Aber obwohl eine geringe Menge Enterotoxin während der exponentiellen Wachstumsphase gebildet wird, sind die bestimmenden Faktoren für die Aktivierung der Sporenbildung dieselben, die auch das *cpe* Gen beeinflussen und die höchsten Enterotoxin-Werte werden während der Sporenbildung erreicht. Lebensmittelvergiftungen sowie die molekulare Genetik und Krankheitshintergrund von *C. perfringens* Enterotoxin wurden ausgezeichnet von Rood und Cole (1) und Stringer (2) untersucht.

Auch wenn keine typische Lebensmittelvergiftung vorliegt, kann *C. perfringens* Enterotoxin *in vivo* produziert werden und Durchfall hervorrufen. Wenn die natürliche Mikroflora im Darm gestört wird, z.B. durch Antibiotika, dann können sich Clostridien in den entstandenen Nischen des Darmtrakts ansiedeln (*Beide*, *Clostridium difficile* und *Clostridium spiroforme* infizieren den empfindlichen Träger auf diese Weise). In einer Studie über *C. perfringens* Durchfallerkrankungen (3) waren 60% auf Antibiotika zurückzuführen. So wie sich die Symptome von durch Lebensmittel verursachtem Botulismus von denen einer *in vivo* Intoxikation in Kleinkindern unterscheiden, so unterscheiden sich auch die klinischen Charakteristika von *C. perfringens* die entweder auf Lebensmittelvergiftung oder auf Antibiotika zurückzuführen sind. Im Fall einer durch Antibiotika verursachten Erkrankung, kann der Durchfall durchschnittlich 10 Tage lang anhalten, oft findet sich Blut und Schleim im Stuhl und Rückfälle können auftreten.

WIRKUNGSWEISE DES TESTS

Der *Clostridium perfringens* Enterotoxin Test benutzt zwei Antikörper zum *C. perfringens* Enterotoxin. Die Mikroanalyse-Vertiefungen der Testpackung sind beschichtet mit einem bewegungsunfähigen polyklonalen Antikörper gegen *C. perfringens* Enterotoxin. Das Konjugat besteht aus einem polyklonalen Antikörper, gebunden mit einer Meerrettich-Peroxidase. Während der Analyse, wird eine Stuhlprobe im Verdünnungspuffer aufgelöst und die verdünnte Stuhlprobe wird dann in die Mikroanalyse-Schalen übertragen. Wenn Enterotoxin in der Stuhlprobe vorhanden ist, dann wird es sich mit dem bewegungsunfähigen polyklonalen Antikörper verbinden und innerhalb der 2-stündigen Inkubationszeit konjugieren. Nicht gebundene Bestandteile werden gewaschen. Anschließend wird das Substrat hinzugefügt, und eine Farbe wird festgestellt aufgrund der Enzym-Antikörper-Antigen Komplexe, die sich bilden wenn Enterotoxin vorhanden ist.

PACKUNGSINHALT

- DIL | SPE** **Verdünnungspuffer**, 40 mL (gepufferte Proteinlösung + 0.02% Thimerosal). Das *Verdünnungspuffer* kann auch als negatives Kontrollmittel benutzt werden (siehe TESTVERFAHREN).
- CONJ | ENZ** **Konjugat**, 7 mL (Polyklonale Antikörper gegen Enterotoxin und gebunden mit Meerrettich-Peroxidase - in einer gepufferten Proteinlösung + 0.02% Thimerosal).
- SUBS | REAG** **Substrat**, 14 mL (gepufferte Lösung, die Tetramethylbenzidin und Peroxyd enthält).
- CONTROL | +** **Positive Kontrolle**, 3.5 mL (Enterotoxin in einer gepufferten Proteinlösung, die 0.02% Thimerosal enthält).
- WASHBUF | 20X** **Waschpuffer-Konzentrat**, 50 mL (20X Konzentrat, das Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung enthält, Reinigungsmittel und 0.2% Thimerosal).
- H₂SO₄ | 0.6N** **Stopplösung**, 7 mL (0.6 N Schwefelsäure). **ACHTUNG: Hautkontakt vermeiden.** Sofort mit Wasser spülen, wenn das Reagenz in Berührung mit der Haut gerät.
- MA | PLT** **12 Analyse-Schalen Streifen**, von denen jeder 8 Schalen enthält, die mit polyklonalen Antikörpern speziell gegen Enterotoxin beschichtet sind (mit Trockenmittel verpackt).

ZUBEHÖR

100 Einwegpipetten aus Plastik 2 Klebefolien 50 Holzstäbchen

NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

Spritzflasche für die *Reinigungsflüssigkeit*
 950 mL destilliertes Wasser zum Verdünnen der *Reinigungsflüssigkeit*
 Inkubationsgerät, eingestellt auf 37°C ± 2°C
 ELISA Lesegerät mit Lesekapazität für duale Wellenlängen mit 450/620 nm oder 450/550 nm, oder singuläre Wellenlängen mit 450 nm (ein dualer Wellenlängen-Leser wird empfohlen; Saugfähigkeit sollte mit 450 nm gemessen werden und mit 620 nm oder 550 nm verglichen werden)
 Abfallbehälter und saugfähiges Papier (z.B. Papiertücher)
 Elektrisches Rührgerät
 Kühlschrank zur Lagerung des Analyse-Sets und der Proben (2° bis 8°C)
 Reagenzgläser für die Verdünnungen

VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Reagenzien von verschiedenen Sets dürfen nicht gemischt werden. Benutzen Sie das Analyse-Set nicht nach dem Verfallsdatum.
2. Reagenzien sollten Raumtemperatur haben bevor sie verwendet werden.
3. Verschlüsse und Fläschchen sind farbkodiert; nicht vertauschen!
4. Vermeiden Sie, den Boden der Analyse-Schalen zu zerkratzen, sonst können erhöhte Absorbierungswerte resultieren.
5. Halten Sie die Tropfflaschen senkrecht damit die korrekte Tropfengröße sichergestellt wird.
6. Microanalyse-Schalen sollten nach dem Gebrauch wie potentiell infektiöser Abfall behandelt und entsorgt werden. Tragen Sie immer Handschuhe während Sie den Test ausführen.
7. Reagenzien enthalten 0.02% Thimerosal als Konservierungsmittel und sollten mit der in Labors üblichen Vorsicht behandelt werden.
8. Die *Stopplösung* enthält 0.6 N Schwefelsäure. Spülen Sie sofort mit Wasser, wenn Hautkontakt erfolgen sollte.
9. Unbenutzte Mikroanalyse Analyse-Schalen müssen mit dem Trockenmittel in den wiederverschließbaren Plastikbeutel zurückgelegt werden, damit sie vor Feuchtigkeit geschützt sind.
10. Waschen Sie die Schalen wie vorgeschrieben um hohe Hintergrundreaktionen zu vermeiden.

- Das *Substrat* ist lichtempfindlich und sollte vor direkter Sonneneinstrahlung oder UV-Lichtquellen geschützt werden.

ABNAHME UND BEHANDLUNG DER STUHLPROBEN

HINWEIS: Die üblichen Methoden für Abnahme und Behandlung der Stuhlproben sind akzeptabel. Stuhlproben sollten so schnell wie möglich in das *Verdünnungspuffer* gegeben werden. Verdünnte Stuhlproben sollten bei Temperaturen zwischen 2° und 8°C gelagert werden. Wenn möglich sollten die Stuhlproben weniger als 24 Stunden alt sein. Kühlschranks Lagerung von vor-verdünnten Stuhlproben ist effektiv, um etwaige Verluste der ELISA-Reaktivität für bis zu 7 Tagen zu reduzieren; das funktioniert aber nicht bei allen Stuhlproben (4). Einfrieren und Auftauen der Proben, insbesondere mehrmaliges Einfrieren und Auftauen, kann Aktivitätsverluste zur Folge haben, weil das Toxin zerfällt. Achten Sie darauf die Stuhlproben gut zu verrühren bevor Sie die Analyse durchführen. Die Stuhlproben müssen gerührt werden bevor sie ins *Verdünnungspuffer* gegeben werden und die verdünnten Proben werden nochmals durchgerührt bevor sie in die Analyse-Schalen gegeben werden. Das *Verdünnungspuffer* wurde so entwickelt, dass das Toxin in den Stuhlproben stabilisiert wird und der Abbau des Toxins minimiert wird. Einwegpipetten, die Bestandteil des Sets sind, sind auf 50, 100, 200 und 300 µL geeicht.

- Benutzen Sie für jede zu testende Stuhlprobe ein eigenes Reagenzglas. Füllen Sie 200 µL *Verdünnungspuffer* in jedes Reagenzglas. *Kennzeichnen Sie das Reagenzglas direkt an der Seitenwand.*
- Für **flüssige Stuhlproben** benutzen Sie eine Plastikpipette um 50 µL der Probe ins Reagenzglas zu übertragen. Achten Sie darauf, dass die flüssigen Proben gleichmäßig in ihrer Konsistenz sind bevor sie übertragen werden.
Für **feste Stuhlproben (feste Stuhlproben von Personen ohne Durchfall sind normalerweise keine geeigneten Proben)** benutzen Sie ein Holzstäbchen um die Probe in das Reagenzglas zu übertragen. Übertragen Sie eine Probe mit etwa 3 mm Durchmesser in das *Verdünnungspuffer*.
- Behandeln Sie die Reagenzgläser 10 Sekunden lang im Vortex-Schüttler und lagern Sie die Reagenzgläser anschließend bei Temperaturen zwischen 2° und 8°C bis ELISA abgeschlossen ist. Behandeln sie die Proben nochmals im Vortex-Schüttler bevor sie die verdünnten Proben in die Analyse-Schalen übertragen. Auf diese Weise werden die Proben gut durchgemischt.

TESTVORBEREITUNG

- WICHTIG** – Alle Reagenzien müssen Raumtemperatur haben bevor sie in der Analyse benutzt werden.
- Bereiten Sie die 1X *Reinigungsflüssigkeit* vor. Das *Waschpufferkonzentrat* wird als 20X Konzentrat geliefert (Ausfall kann eventuell sichtbar sein). Es sollte auf ein Volumen von 1 Liter verdünnt werden, indem 50 mL des Konzentrats mit 950 mL destilliertem Wasser vermengt werden. Kennzeichnen Sie die Flasche. Lagern Sie eventuelle Restmengen der 1X *Reinigungsflüssigkeit* zwischen 2° und 8°C.
- Bereitigung der Analysestreifen. Jeder Streifen enthält 8 Schalen, die mit spezifischen polyklonalen gereinigten Antikörpern gegen *C. perfringens* Enterotoxin beschichtet sind. Jede Probe oder Kontrolle nimmt eine dieser beschichteten Schalen in Anspruch. Bestimmen Sie die Anzahl der benötigten Schalen. Nicht benötigte Schalen werden zusammen mit dem Trockenmittel in den Plastikbeutel zurückgelegt und sorgfältig wieder verschlossen.

TESTVERFAHREN

- Geben Sie einen Tropfen (50 µL) des *Konjugats* (roter Verschluss) in jede Schalenvertiefung. Achten Sie darauf jede Flasche senkrecht zu halten. Benutzen Sie je 1 Schalenvertiefung für jede Stuhlprobe, 1 für das *Positive Kontrolle* und 1 Schalenvertiefung für die *Negativ-Kontrolle* (z.B. *Verdünnungspuffer*). Markierungen zur Identifizierung können direkt auf die Seite der Schalenvertiefung geschrieben werden.

2. Übertragen Sie 100 µL (2 Tropfen mit der mitgelieferten Einwegpipette) der verdünnten Proben auf die Analyse-Schale. Geben Sie 1 Tropfen (50 µL) der *Positive Kontrolle Reagenzie* (schwarzer Verschluss) auf die Schalenvertiefung zur Positiv-Kontrolle und 50 µL (1 Tropfen mit der mitgelieferten Einwegpipette) der negativen Kontrollflüssigkeit (z.B. *Verdünnungspuffer*) auf die Schalenvertiefung zur Negativ-Kontrolle.
3. Schneiden Sie die Klebefolie so zu, dass das Schnittstück die Schalenvertiefungen vollständig abdeckt. Kleben Sie die Folie über die Schalenvertiefungen und inkubieren sie diese bei $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ für 2 Stunden.
4. Schütteln Sie den Inhalt der Schalen in einen Abfallbehälter.
5. Waschen Sie jede Schalenvertiefung mit der 1X *Reinigungslösung* gut aus; benutzen Sie dazu eine Spritzflasche mit feiner Düse, und spritzen Sie die *Reinigungsflüssigkeit* kräftig auf den Boden der Schalenvertiefung. Füllen Sie die Schalenvertiefungen mit der *Reinigungsflüssigkeit* und entleeren Sie dann die Schalen in den Abfallbehälter. Klopfen Sie die umgedrehten Schalen auf ein trockenes Papiertuch und wiederholen Sie dann Schritte Nr.4 und Nr.5 **viernmal** und benutzen Sie jedes Mal ein neues, trockenes Papiertuch. Wenn irgendwelche Restbestandteile noch in den Schalen zu sehen sind, waschen Sie diese solange aus bis alle Reste entfernt sind.
6. Nach dem Waschen entfernen Sie alle Restflüssigkeit von den Schalen, indem Sie diese nochmals gegen ein trockenes Papiertuch klopfen bis keine Flüssigkeit mehr abgegeben wird. *Entsorgen Sie die Papiertücher und Stuhlprobenbehälter in angemessener Weise.*
7. Geben Sie 2 Tropfen (100 µL) des *Substrats* (blauer Verschluss) in jede Schalenvertiefung. Inkubieren Sie die Schalen bei Raumtemperatur für 15 Minuten.
8. Geben Sie 1 Tropfen (50 µL) der *Stopplösung* (gelber Verschluss) in jede Schalenvertiefung. Klopfen Sie leicht an die Analyse-Schalen und warten Sie 2 Minuten bis zum Ablesen. Hinzufügen der *Stopplösung* konvertiert die blaue Farbe in gelbe Farbe; die Farbveränderungen werden quantifiziert, indem die optische Dichte bei 450 nm auf einem ELISA Mikroplattenleser gemessen wird (Vergleichswerte sind 620 oder 550 nm auf einem dualen Wellenlänge-Lesegerät). Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen Luft. Wischen Sie die Unterseite jeder Schalenvertiefung ab bevor die optische Dichte gemessen wird. Wenn ein ELISA-Lesegerät nicht verfügbar ist, kann das Testergebnis visuell in guten Lichtverhältnissen gegen einen weißen Hintergrund abgelesen werden. Wenn ein duales Lesegerät verwendet wird, dann führen Sie den Abgleich des Nullwertes bei 620 oder 550 nm gegen Luft durch und lesen Sie bei 450 nm das Testergebnis ab. Lesen Sie innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der *Stopplösung* ab.

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Jede Testserie muss eine positive und eine negative Kontrolle einschließen.
2. Positive und negative Kontrollen müssen innerhalb der Toleranzgrenzen liegen, sonst ist der Test nicht gültig. Wenn die Resultate außerhalb der Toleranzgrenzen liegen, benachrichtigen Sie bitte den Technischen Service.
 - a) Positive Kontrolle muss deutlich gelb sein.
Wenn auf einem Spektrometer abgelesen wird, dann gelten folgende Toleranzwerte:
 OD_{450} oder $\text{OD}_{450/620}$ oder $\text{OD}_{450/550} \geq 0.500$.
 - b) Negative Kontrolle muss visuell klar sein.
Wenn auf einem Spektrometer abgelesen wird, dann muss gelten:
 $\text{OD}_{450} < 0.120$, oder die $\text{OD}_{450/620}$ oder $\text{OD}_{450/550} < 0.080$.
3. Schalen die visuell klar scheinen, aber eine Absorption von ≥ 0.120 ausweisen, sollten auf der Unterseite abgewischt werden und die Absorption erneute gemessen werden.
4. Visuelle Ablesung muss bei guten Lichtverhältnissen und gegen einen weißen Hintergrund durchgeführt werden.

5. Eine Probe, die nur ein schwaches positives Testergebnis zeigt (z.B. <0.200) und die neben einer stark positiven Probe liegt, sollte erneut getestet werden, damit sicher gestellt ist, dass keine versehentliche Übertragung erfolgte.

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

1. Visuelles Ablesen

Negativ = Farblos

Positiv = Jede gelbe Farbe

2. Spektrophotometrische singuläre Wellenlänge bei 450 nm

Negativ = $OD_{450} < 0.120$

Positiv = $OD_{450} \geq 0.120$

3. Spektrophotometrische duale Wellenlänge bei 450/620 nm oder 450/550 nm

Negativ = $OD_{450/620 \text{ oder } 450/550} < 0.080$

Positiv = $OD_{450/620 \text{ oder } 450/550} \geq 0.080$

Ein positives Testergebnis zeigt an, dass *C. perfringens* Enterotoxin in der Stuhlprobe vorhanden ist.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Bei Lieferung sollte das Analyse-Set genau inspiziert werden, damit sicher gestellt wird, dass die Komponenten nicht gefroren sind oder sich warm anfühlen aufgrund unsachgemäßen Transportbedingungen. Jede Komponente sollte auf Schadstellen untersucht werden. Das Verfalldatum ist auf dem Verpackungsetikett angegeben. Verfalldaten für die einzelnen Komponenten sind auf den Komponentenetiketten angegeben. Das Analyse-Set mit den Reagenzien, die eine bestimmte Haltbarkeit aufweisen, sollte bei Temperaturen zwischen 2° und 8°C gelagert werden, und sollte sofort nach dem Gebrauch wieder in den Kühlschrank zurückgelegt werden.

FOR INFORMATION ONLY

C. perfringens Enterotoxin Test - FRANÇAIS

UTILISATION PRÉVUE

Le Test de l'entérotoxine de *Clostridium perfringens* est une analyse immuno-enzymatique pour la détection rapide de l'entérotoxine produite par *Clostridium perfringens*. Elle peut être utilisée pour détecter l'entérotoxine dans les spécimens fécaux provenant des individus suspectés d'avoir la maladie associée avec *C. perfringens*. L'analyse doit être utilisée pour assister dans le diagnostic de la maladie associée avec l'entérotoxine de *C. perfringens* et les résultats doivent être considérés en conjonction avec l'histoire du patient. POUR USAGE INVESTIGATIF UNIQUEMENT. Les caractéristiques de performances de ce produit n'ont pas été établies.

EXPLICATION

La maladie intestinale causée par l'entérotoxine de *C. perfringens* est le résultat d'une intoxication alimentaire qui suit la consommation de nourriture contaminée précuite qui n'a pas été préservée ou réchauffée de façon appropriée. La maladie a été rapportée pour la première fois à la fin du siècle dernier et a été de mieux en mieux caractérisée depuis le milieu des années quarantes (1940). Une diarrhée et des crampes abdominales sont des signes typiques alors que vomissement et mort sont rares. Les symptômes apparaissent entre 12 et 24 heures suivant l'ingestion du repas contaminé et durent à peu près 24 heures. Durant l'intoxication alimentaire l'organisme est consommé, puis la sporulation a lieu dans l'intestin et les entérotoxines sont libérées pour produire la maladie. L'entérotoxine est le produit du gène *cpe* et les deux phénotypes bactériens sont désignés Ent+ et Ent-. Évidemment, puisque que la majorité des espèces Ent- analysées peuvent sporuler, la production d'entérotoxine n'est pas une condition nécessaire pour la formation de spores. Toutefois, bien qu'une certaine quantité d'entérotoxines est produite durant la phase de croissance exponentielle, les facteurs de transcriptions qui activent le gène de la sporulation affecteront l'augmentation de la régulation du gène *cpe* de même qu'un niveau d'entérotoxine maximum se produisant durant la sporulation. L'intoxication alimentaire ainsi que la génétique moléculaire et la pathogénèse de l'entérotoxine de *C. perfringens* ont été passées en revue en détail par Rood et Cole (1) et Stringer (2).

Même en l'absence d'une intoxication alimentaire typique, l'entérotoxine de *C. perfringens* peut être produite *in vivo*, causant une diarrhée. Suivant la disruption de la flore microbienne normale par des agents tels que les antibiotiques, le clostridium peut coloniser la niche écologique évacuée dans les entrailles. (*Clostridium difficile* et *Clostridium spiroforme* peuvent tous les deux infecter les réceptacles susceptible de cette manière). Dans une étude de la diarrhée de *C. perfringens* (3), 60% étaient reliées à l'usage des antibiotiques. Autant les symptômes provenant du botulisme alimentaire diffèrent de ceux observés parmi les nouveaux-nés par intoxication *in vivo*, autant les caractéristiques de l'intoxication alimentaire causée par *C. perfringens* et celles reliées aux maladies provenant de l'usage d'antibiotiques différeront. Dans ce dernier cas, la diarrhée dure en moyenne 10 jours et la présence de sang dans la matière fécale et dans la muqueuses sont commun et des rechutes peuvent se produire.

PRINCIPE DE L'ANALYSE

L'entérotoxine de *Clostridium perfringens* Test utilise deux anticorps contre l'entérotoxine de *C. perfringens*. Les puits de micro-titre fournis avec le kit contiennent des anticorps polyclonaux immobilisés contre l'entérotoxine de *C. perfringens*. Le *Conjugué* consiste en un anticorps polyclonal conjugué au peroxydase de raifort. Dans l'analyse, un aliquote d'un spécimen fécal est émulsifié dans le *Diluant* et le spécimen ainsi dilué est alors transféré au puit micro-titre. Si l'entérotoxine est présente dans le spécimen, elle s'attachera à l'anticorps polyclonal immobilisé et conjugué durant la phase d'incubation de 2 heures. Le matériel non-attaché si présent est éliminé durant les étapes de nettoyage. Suivant l'addition du *Substrat*, une couleur est détectée, causée par le complexe enzyme-anticorps-antigène qui se forme en la présence d'entérotoxine.

MATÉRIEAUX FOURNIS

- DIL** **SPE** **Diluant**, 40 mL (solution protéine tampon + 0,02% thimérosal). Le *Diluant* peut aussi être utilisé comme solution de control négatif (voir PROCÉDURES D'ANALYSE).
- CONJ** **ENZ** **Conjugué**, 7 mL (anticorps polyclonal spécifique pour l'entérotoxine attaché au peroxydase de raifort – dans une solution protéine tampon + 0,02% thimérosal).
- SUBS** **REAG** **Substrat**, 14 mL (solution tampon contenant tétraméthylbenzidine et peroxyde).
- CONTROL** **+** **Réactif Contrôle Positif**, 3,5 mL (entérotoxine dans une solution tampon contenant 0,2% thimérosal).
- WASHBUF** **20X** **Tampon de Lavage à Concentration 20X**, 50 mL (20X concentré contenant du salin tampon aux phosphates, du détergent et 0,2% thimérosal).
- H₂SO₄** **0,6N** **Solution d'Arrêt**, 7 mL (0,6 N acide sulfurique). **Attention: Éviter tout contact avec la peau.** Laver immédiatement avec de l'eau si le contact se produit.
- MA** **PLT** **12 Bandes de Puits d'Analyses**, chacune consiste de 8 puits recouverts avec des anticorps polyclonaux spécifiques pour l'entérotoxine (préservé avec matériel déshydratant)

ACCESSOIRES

100 pipettes en pastique disposable 2 Feuilles adhésive en plastique
50 bâtons applicateur

MATÉRIEAUX NON FOURNIS

Bouteille pour *Solution de Nettoyage*

950 mL d'eau distillée pour diluer la *Solution de Nettoyage*

Incubateur réglé à 37°C ± 2°C

Lecteur ELISA pouvant mesurer à longueur d'ondes duel (450/620 nm) ou à une seule

longueur d'ondes de 450 nm (un analyseur à longueur d'ondes duel est recommandé;

l'absorbance doit être mesurée à 450 nm et référencée à 620 nm ou 550 nm)

Récipient pour déchets et Serviettes en papier ou feuilles absorbantes

Mélangeur de vortex

Tubes pour dilutions

Réfrigérateur pour le stockage du kit et des spécimens (réglé entre 2° et 8°C)

PRÉCAUTION D'EMPLOIS

1. Les réactifs provenant de kit différents ne doivent pas être mélangés. N'utiliser pas le kit après sa date d'échéance.
2. Les réactifs doivent être à température ambiante avant utilisation.
3. Les chapeaux et les bouts de pipettes sont codés par couleur: ne les mélangez pas!
4. Quand vous manipulez les puits d'analyses, évitez d'égratiner le fond des puits parceque des mesures élevées d'absorbance peuvent résulter.
5. La bouteille de compte-gouttes doit être maintenue verticalement pour assurer une goutte de taille appropriée.
6. Manipuler les spécimens et utiliser les puit de micro-titre en faisant attention de considérer qu'ils peuvent transmettre des maladies infectieuses. Utiliser des gants pendant les analyses.
7. Les réactifs contiennent 0,02 % de thimerosal comme préservatif et doivent être manipulés par des procédures [attentives] normales de laboratoire.
8. La *Solution d'Arrêt* contient 0,6N d'acid sulfurique. Rincer avec de l'eau immédiatement si un contact se produit.
9. Les micropuits inutilisés doivent être placés à l'intérieur de la poche rescellable avec le déshydratant pour les protéger de l'humidité.
10. Exécuter la procédure de nettoyage tel qu'il a été décrit pour éviter des réactions non-spécifiques élevées.
11. Le Substrat est sensible à la lumière et doit être protégé de la lumière provenant directement du soleil et des sources de lumière ultraviolet.

COLLECTION ET MANIPULATION DES SPÉCIMENS FÉCAUX

NOTER: Les procédures standard internes de collection et de manipulation utilisées pour les spécimens fécaux sont appropriées. Les spécimens doivent être transportés et dilués dans le *Diluant* du kit aussitôt que possible. Les spécimens doivent être stockés entre 2° et 8°C. Quand cela est possible, examiner les échantillons qui ont moins de 24 heures. La réfrigération des échantillons pré-dilués est un moyen efficace pour réduire la perte d'activité par ELISA pour une période de 7 jours au maximum; ceci n'est pas nécessairement valable pour tous les spécimens fécaux (4). La congélation et décongélation du spécimen, surtout d'une manière répétée, peut produire une perte d'activité causée par la dégradation de la toxine. Assurez vous que les spécimens aient été complètement mélangés avant de faire l'analyse. Cela inclue le mélange complet (par Vortex) du spécimen avant le transfert au *Diluant* ainsi que le mélange complet du spécimen dilué avant le transfert au puit d'analyse. Le *Diluant* a été formulé pour stabiliser la toxine dans les spécimens fécaux et pour réduire au minimum la dégradation. Les pipettes jetables qui sont incluses dans le kit d'accessoires sont graduées à 50, 100, 200, et 300 µL.

1. Préparer un seul tube de dilution pour chaque spécimen à analyser. Ajouter 200 µL de *Diluant* à chaque tube. *Marquer le tube directement sur le côté.*
2. Pour les spécimens liquides, utiliser une pipette en plastique pour transférer 50 µL du spécimen au tube. Assurez vous que le spécimen liquide soit suspendu d'une façon homogène avant le transfert.
Pour les spécimens formés (les spécimens solides provenant d'individus sans diarrhée sont normalement des échantillons inadéquats), utiliser un bâton applicateur pour transférer le spécimen fécal au tube. Transférer au *Diluant* une quantité égale à un diamètre d'environ 3 mm avec le bâton applicateur.
3. Vortexer les tubes pendant 10 secondes et stocker entre 2° and 8°C jusqu'à ce que l'ELISA soit faite. Vortexer encore une fois avant le transfert du spécimen dilué au puit micro-titre. Cela garantit le mélange complet du spécimen.

PRÉPARATION PRÉLIMINAIRES

1. IMPORTANT – Tous les réactifs doivent être à température ambiante avant utilisation pour l'analyse.
2. Préparer la *Solution de Nettoyage 1X*. Le *Tampon de Lavage à Concentration 20X* est fournis en concentré 20X (un précipité peu être apparent). Il doit être dilué pour un volume total de 1 litre en ajoutant 50 mL du concentré à 950 mL d'eau distillée. Marquer la bouteille. Stocker la *Solution de Nettoyage 1X* non-utilisée entre 2° et 8°C.
3. Préparation des *Bandes d'Analyses*. Chaque bande contient 8 puits recouverts par des anticorps polyclonaux spécifiques contre l'entérotoxine de *C. perfringens* et purifiés par affinité. Chaque spécimen ou Control utilisera l'un de ces puits recouverts. Déterminer le nombre de puits nécessaire à utiliser. Les puits d'analyses non-utilisés doivent être retournés au sac en plastique et soigneusement rescellés avec du déshydratant.

PROCÉDURES D'ANALYSE

1. Ajouter 1 goutte (50 µL) de *Conjugué* (chapeau rouge) à chaque puit. Assurez vous de maintenir la bouteille verticalement quand vous ajoutez les gouttes. Utiliser 1 puit pour chaque spécimen fécaux, 1 puit pour le *Contrôle Positif* et 1 puit pour le Control négatif (c.a.d. le *Diluant*). Des marques d'identifications peuvent être inscrites directement sur le coté des puits.
2. Transférer 100 µL (2 gouttes à l'aide d'une pipette de transfert du kit d'accessoires) du spécimen dilué dans le puit d'analyse. Ajouter 1 goutte (50 µL) du *Contrôle Positif* (chapeau noir) au puit désigné pour le control positif et 50 µL (1 goutte à l'aide d'une pipette de transfert fournis) du control négatif (c.a.d. le *Diluant*) au puit désigné pour le control négatif.
3. Couper la feuille en plastique adhésive afin d'obtenir les dimensions nécessaires pour couvrir les puits. Couvrir les puits et incubé les à 37°C ± 2°C pour 2 heures.
4. Secouer le contenu hors des puits d'analyse dans un récipient pour déchets.
5. Laver chaque puit en utilisant la *Solution de Nettoyage 1X* dans une bouteille d'éjection à ouverture réduite, en dirigeant la *Solution de Nettoyage* au fond du puit

vigoureusement. Remplir les puits, puis secouer la *Solution de Nettoyage* en dehors du puit dans le récipient à déchets. Rabattre la plaque inversée sur une serviette en papier et répéter les étapes numéros 4 et 5 quatre fois en utilisant une serviette en papier à chaque fois. Si des particules sont observables dans les puits, continuer le nettoyage jusqu'à ce que toutes les particules aient été enlevées.

6. Après le nettoyage, enlever complètement le liquide résiduel dans les puits en frappant la plaque une fois de plus sur une serviette sèche en papier jusqu'à ce que toutes les traces du liquide aient disparu. *Disposer des serviettes en papier et du récipient pour le spécimen de manière adéquate.*
7. Ajouter 2 gouttes (100 μL) de Substrat (chapeau bleu) à chaque puit. Incuber les puits à température ambiante pour 15 minutes.
8. Ajouter une goutte (50 μL) de *Solution d'Arrêt* (chapeau jaune) à chaque puit. Doucement tapoter les puits et attendre 2 minutes avant la mesure. L'addition de la *Solution d'Arrêt* transforme la couleur bleue en une couleur jaune qui peut être dosée en mesurant la densité optique à 450 nm sur un lecteur microplaque ELISA (référence à 620 ou 550 nm pour un lecteur de longueur d'onde dual). L'instrument doit être calibré à son zéro à l'aide d'air. Essuyer le dessous de chaque puit avant de mesurer la densité optique. Si un lecteur ELISA n'est pas disponible, l'analyse peut être évaluée visuellement sous de bonnes conditions d'exposition de lumière contre un fond blanc. Si un lecteur de longueur d'onde dual est utilisé, démarquer le zéro vis à vis de l'air à 620 ou 550 nm et mesurer à 450 nm. La mesure doit être obtenue pas plus de dix minutes après l'addition de la *Solution d'Arrêt*.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

1. Un contrôle positif et négatif doit être fait avec chaque série d'analyses de spécimens.
2. Les contrôles positifs et négatifs doivent être compris dans leurs marges respectives ou alors l'analyse n'est pas valide. Si les résultats sont en dehors de ces marges, veuillez contacter les Services Techniques.
 - a) Le Contrôle Positif doit avoir une couleur évidente jaune.
Si le contrôle positif est lu à l'aide d'un spectrophotomètre, la DO_{450} ou la $DO_{450/620}$ ou $DO_{450/550}$ doit être $\geq 0,500$.
 - b) Le Contrôle Négatif doit être visuellement clair.
Si le contrôle négatif est lu à l'aide d'un spectrophotomètre, la DO_{450} doit être $< 0,120$, ou la $DO_{450/620}$ ou $DO_{450/550}$ doit être $< 0,080$.
3. Les puits qui sont clairs visuellement mais qui produisent une absorbance de $\geq 0,120$ doivent être essuyés en dessous et remesurés.
4. Les évaluations visuelles doivent être obtenues sous de bonnes conditions d'exposition de lumière contre un fond blanc.
5. Un échantillon qui produit un résultat positif faible (c.a.d. $< 0,200$) et qui est adjacent à un échantillon à signal positif fort, doit être répété pour s'assurer qu'un transfert ne s'est pas produit.

INTERPRÉTATIONS DES RÉSULTATS

1. Évaluation Visuelle

Négatif = Sans couleur

Positif = Toute couleur jaune

2. Spectrophotométrique Longueur d'Onde Unique à 450 nm

Négatif = $DO_{450} < 0,120$

Positif = $DO_{450} \geq 0,120$

3. Spectrophotométrique Longueur d'Onde dual à 450/620 nm ou 450/550 nm

Négatif = $DO_{450/620}$ ou $DO_{450/550} < 0,080$

Positif = $DO_{450/620}$ ou $DO_{450/550} \geq 0,080$

Une analyse résultant en un positif indique que l'entérotoxine de *C. perfringens* est présente

dans le spécimen fécaux.

DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

À l'arrivée, le kit doit être inspecté pour s'assurer que chaque composant n'est pas été congelé ou chaud au touché, ce qui pourrait être causé par des conditions de transports inadéquates. Chaque composant dans le kit doit être inspecté pour s'assurer qu'il n'y ait pas de fuite. La date d'échéance du kit est indiquée sur l'étiquette. La date d'échéance pour chaque composant est énumérée sur les étiquettes individuellement. Le kit contenant les réactifs avec les durées de conservation indiquées doit être stocké entre 2 ° et 8°C et doit être retourné au réfrigérateur aussitôt que possible après utilisation.

REFERENCES

1. Rood, J. I., and S. T. Cole. 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* 55:621-648.
2. Stringer, M. F. 1985. *Clostridium perfringens* type A food poisoning. In "Clostridia in Gastrointestinal Disease", S. P. Borriello (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 177-193.
3. Borriello, S. P., H. E. Larson, F. E. Barclay, and A. R. Welch. 1987. *Clostridium perfringens* enterotoxin-associated diarrhoea. In "Recent Advances in Anaerobic Microbiology." S. P. Borriello (Ed.). Martinus Hijhoff, Boston, Massachusetts, pp. 33-42.
4. Data on file.

Other high quality intestinal diagnostics available from TECHLAB®, Inc.

<u>Product #</u>	<u>Description</u>
T5000	<i>C. difficile</i> Toxin/Antitoxin Kit
T5002	LEUKO-TEST (latex agglutination)
T5003	<i>C. DIFFICILE</i> TOX-B TEST
T5008	IBD-CHEK®
T5009	IBD-SCAN®
PT5012	GIARDIA II
PT5014	CRYPTOSPORIDIUM II
T5015	<i>C. DIFFICILE</i> TOX A/B II™
T5016	ASCA-CHEK
T5017	<i>E. HISTOLYTICA</i> II
T5018	IBD EZ VUE™
T5025	<i>C. DIFF</i> CHEK™ - 60
T5029	<i>C. DIFF</i> QUIK CHEK®
T5031	GIARDIA/CRYPTOSPORIDIUM CHEK®
T5033	TOX A/B QUIK CHEK®
T9015	STOOL-PREP™

FOR INFORMATIONAL USE ONLY