

# RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin

N.º producto: C0601



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

Teléfono: +49 (0) 61 51 - 81 02-0/Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20



## 1. Uso previsto

Para diagnósticos *in vitro*. El inmunoensayo enzimático RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin permite la identificación cualitativa de enterotoxinas de *Clostridium perfringens* en muestras de heces humanas.

## 2. Resumen y descripción del ensayo

*Clostridium perfringens* son, como todos los Clostridia, bacterias anaerobias gram positivas ubicuas y formadoras de esporas que forman parte generalmente de la flora del intestino grueso humano. Éstas difieren de otros Clostridia por carecer de los flagelos peritricos. Hay cinco cepas de *Clostridium perfringens*, que se diferencian en los tipos A a E. La cepa tipo A es, junto con el tipo C causante de la enteritis necrótica, la más importante para humanos en determinadas condiciones (dieta, deficiencia de tripsina), aunque los cinco tipos se encuentran en animales.

Estos grupos se clasifican a tenor de la producción de cuatro toxinas principales (Alpha, Beta, Epsilon, Iota), todas ellas citotóxicas y necrotizantes. Además de estas cuatro toxinas principales, determinadas cepas de *C. perfringens* producen otras toxinas de efecto patógeno para humanos, entre ellas la enterotoxina (un polipéptido de 35 kDa de tamaño).

*C. perfringens* puede ingerirse en grandes cantidades al consumir alimentos almacenados incorrectamente, especialmente en el caso de los precocinados. *C. perfringens* producirá grandes cantidades de enterotoxinas (CPE) causantes de trastornos intestinales con diarrea y cólicos abdominales. Los signos y síntomas comienzan aproximadamente 8 - 24 horas después de ingerir alimentos contaminados y remiten transcurridas otras 24 horas. La enfermedad no suele ir acompañada de vómitos, fiebre o cefaleas. Además de contaminación alimentaria, *C. perfringens* causa aproximadamente el 10% de todos los casos de diarrea asociada a antibióticos (DAA) y el 5 – 20% de los casos de diarrea esporádica (SPOR) no provocados por contaminación alimentaria. Esta forma de diarrea puede llegar a provocar hasta colitis pseudomembranosa (CPM) con formas de evolución de la enfermedad mucho más graves y duraderas (10 – 30 días), a menudo con hallazgos de sangre y mucosa en las heces. El examen histológico de las biopsias de tramos inferiores del intestino grueso y del recto revela zonas edematosas derivadas de las lesiones causadas por las CPE.

Investigaciones recientes han demostrado que el código de la enterotoxina puede ser cromosómico (contaminación alimentaria) y episómico (en DAA y SPOR).

El test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin se suministra paralelamente al test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B y constituye un sistema de identificación importante para determinar las causas de diarrea asociada a antibióticos y diarrea esporádica. Es una herramienta que proporciona un diagnóstico rápido y fiable y representa una valiosa ayuda en el proceso de decisión terapéutica.

### 3. Principio de ensayo

En el ensayo RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin se utilizan anticuerpos específicos según el método tipo sandwich. La superficie de los pocillos de la placa está recubierta de anticuerpos monoclonales contra epítomos de la enterotoxina de *C. perfringens*. Una suspensión de la muestra de heces analizada y las muestras control se pipetea en los pocillos de la placa junto con anticuerpos anti-enterotoxina biotinilados (conjugado 1) y se incuba todo a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Después de un paso de lavado, se añade conjugado de poliperoxidasas y estreptavidina (conjugado 2) y se incuba nuevamente a temperatura ambiente (20 - 25 °C). En las muestras que contienen enterotoxinas, los anticuerpos inmovilizados, las enterotoxinas y los anticuerpos conjugados forman un complejo tipo sandwich. En el siguiente paso de lavado se elimina el conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina no unido. En las muestras positivas, la adición de un sustrato provoca que la coloración de la solución con el enzima unido vire de incolora a azul. La adición de un reactivo de parada provoca que la coloración cambie de azul a amarillo. La extinción es proporcional a la concentración de CPE presentes en la muestra.

### 4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones.

Plate	96	Placa de pocillos, 12 tiras de pocillos (divisibles) en el portatiras; recubiertos con los anticuerpos monoclonales específicos contra la enterotoxina de <i>Clostridium perfringens</i>
Diluent   1	100 ml	Tampón de dilución de muestra, solución salina tamponada con proteína, lista para usar, color azul
Wash	100 ml	Tampón de lavado, solución salina tamponada con fosfato (concentración 10x); contiene timerosal 0,1 %
Control   +	2 ml	Control positivo, enterotoxina inactivada, listo para usar
Control   -	2 ml	Control negativo (tampón de dilución de muestra), listo para usar
Conjugate   1	13 ml	Anticuerpos anti-enterotoxina conjugados con biotina en solución proteica estabilizada; listo para usar, color azul
Conjugate   2	13 ml	Conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina en solución proteica estabilizada, listo para usar, color naranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrógeno/TMB; listo para usar
Stop	12 ml	Reactivo de parada, ácido sulfúrico 1 N, listo para usar

## 5. Reactivos y almacenamiento

Todos los reactivos deben almacenarse a 2 - 8 °C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Si se almacena a 2 - 8 °C, el tampón de lavado diluido puede utilizarse durante un periodo máximo de 4 semanas. Evitar la contaminación microbiana. Una vez alcanzada la fecha de caducidad, no es posible garantizar la calidad.

Abrir la bolsa de aluminio con tijeras sin que se rompa el precinto de seguridad. Retornar inmediatamente las tiras de pocillos que no se necesiten a la bolsa de aluminio y guardarlas a 2 - 8 °C.

El sustrato incoloro debe protegerse de la luz directa para evitar la descomposición o el viraje a color azul por efecto de la autooxidación. No utilizar el sustrato si ha virado a color azul.

## 6. Reactivos adicionales y accesorios necesarios

### 6.1. Reactivos suministrados

- Agua destilada o desionizada

### 6.2. Accesorios

- Tubos de ensayo
- Pipetas desechables (ref. Z0001)
- Mezclador de vórtice (opcional, ver 9.3.)
- Micropipeta de 50 - 100 µl y 1 ml
- Probeta (1.000 ml)
- Cronómetro
- Dispositivo de lavado de placas de pocillos o pipetas multicanal (300 µl)
- Fotómetro para placas de pocillos (450 nm y filtro de referencia de 620 - 650 nm)
- Papel de filtro (toallas desechables)
- Recipiente para residuos de laboratorio

## 7. Precauciones para usuarios

Para diagnósticos *in vitro* exclusivamente.

Este ensayo debe realizarlo exclusivamente personal de laboratorio cualificado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Respetar siempre las instrucciones de uso de este ensayo.

No pipetear las muestras y los reactivos con la boca y evitar el contacto con lesiones de la piel y mucosas. Llevar equipo de protección personal (guantes, bata, gafas de protección) al manipular las muestras y lavar las manos después de finalizar el ensayo. No fumar, comer o beber en las zonas en que se procesen las muestras.

Para más información, consultar la hoja de datos de seguridad (MSDS) en [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com). El kit incluye un control positivo que contiene la enterotoxina inactivada. Igual que las muestras de heces, deben tratarse como material potencialmente infeccioso y manejarse de acuerdo con lo establecido en las normativas de seguridad aplicables.

El tampón de lavado contiene timerosal 0,1 % como conservante. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel o con las mucosas.

Los reactivos y el material usados deben desecharse de forma correcta y responsable. Respetar la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

## 8. Obtención y almacenamiento de muestras

Guardar el material del ensayo a 2 - 8 °C hasta que se vaya a usar. Si el material no puede utilizarse en ensayos hasta dentro de tres días, recomendamos almacenarlo a como mínimo a -20 °C. No congelar y descongelar la muestra innecesariamente. Después de diluir una muestra de heces en tampón de dilución 1:11, puede almacenarse a 4 °C y utilizarse en un plazo de siete días.

No guardar las muestras de heces y los frotis rectales en recipientes de transporte que contengan materiales con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes porque pueden interferir con el test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin. Para el test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin pueden utilizarse las muestras de heces embaladas en medios de transporte comerciales (Cary Blair, Amies). No obstante, debe tenerse en cuenta el paso de dilución previa necesario de la muestra. En la medida de lo posible, la dilución final de la muestra de heces en Diluent 1 debe ser exactamente 1:11.

En caso de utilizar frotis rectales, comprobar si el volumen de material fecal es suficiente (aprox. 100 mg) para el ensayo.

La localización de contactos debe incluir muestras de heces de personas contactadas que no presenten síntomas clínicos para poder identificar portadores asintomáticos.

## 9. Procedimientos de ensayo

### 9.1. Información general

Los reactivos y la placa de pocillos **Plate** deben adquirir temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de utilizarlos. No sacar las tiras de pocillos de la bolsa de aluminio hasta que hayan alcanzado temperatura ambiente. Mezclar a fondo los reactivos inmediatamente antes de usarlos. Después de usar, volver a almacenar las tiras de pocillos (en bolsas de aluminio) y los reactivos a 2 - 8°C. Desechar las tiras de pocillos usadas. No utilizar los reactivos y las tiras de pocillos en caso si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas.

Para evitar la contaminación cruzada, las muestras no deben entrar en contacto directo con los componentes del kit.

No realizar el ensayo en condiciones de luz solar directa. Recomendamos cubrir la placa de pocillos o colocar encima un envoltorio plástico para evitar pérdidas por evaporación.

## 9.2. Preparación del tampón de lavado

Mezclar 1 parte de tampón de lavado concentrado **Wash** con 9 partes de agua destilada. Calentar previamente el concentrado en baño maría a 37 °C para disolver los posibles cristales presentes.

## 9.3 Preparación de las muestras

Llenar un tubo de ensayo etiquetado con un 1 ml de tampón de dilución de muestra RIDASCREEN® **Diluent |1**. Utilizar una pipeta desechable (ref. Z0001) para extraer una muestra de heces fluida (aprox. 100 µl) hasta justo por encima de la segunda marca y añadirla al tampón del tubo de ensayo para formar una suspensión. Para formar una suspensión con una muestra de heces sólida, añadir una cantidad equivalente (100 mg) con una espátula o asa de siembra desechable.

Homogeneizar la suspensión de heces mediante aspiración y eyección con una pipeta desechable o mediante agitación en un mezclador de vórtice. Dejar reposar brevemente la suspensión para que sedimenten las partículas de heces gruesas; el sobrenadante clarificado de la suspensión puede usarse directamente en el ensayo. Si el procedimiento de ensayo se realiza en un sistema ELISA automatizado, el sobrenadante debe estar libre de partículas. En este caso, es aconsejable centrifugar la muestra a 2.500 G durante 5 minutos.

### **Nota:**

Las muestras de heces diluidas en **Diluent |1** pueden emplearse en cualquier otro test RIDASCREEN® que utilice también el **Diluent |1**.

## 9.4. Primera incubación

Después de llenar un número suficiente de pocillos del portatiras, pipetear 100 µl del control **Control |+** positivo, del control **Control |-** negativo o de la suspensión de muestras de heces a los pocillos. Acto seguido, añadir 100 µl del anticuerpo conjugado con biotina **Conjugate |1** y mezclar (golpeado suavemente contra un lado de la placa); incubar a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 60 minutos.

## 9.5. Lavado

Es fundamental realizar un lavado exhaustivo si quieren obtenerse resultados correctos y, en consecuencia, deben respetarse rigurosamente los pasos de lavado especificados en las instrucciones. Vaciar las sustancias incubadas en los pocillos en un recipiente de residuos para eliminarlas de acuerdo con los requisitos oficiales. Voltrear la placa sobre papel absorbente y golpearla suavemente para eliminar los restos de humedad. A continuación, lavar la placa

cinco veces con 300 µl de tampón de lavado cada vez. Después de cada paso de lavado, sacudir los pocillos sobre una pieza de papel absorbente seco y limpio para verificar que están completamente vacíos.

**Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas o un equipo ELISA automático, comprobar si el equipo está ajustado correctamente; solicitar los ajustes al fabricante, si es preciso.**

**Los equipos suministrados por R-Biopharm están programados con ajustes y protocolos de trabajo validados. A fin de no bloquear las boquillas de lavado, utilizar solamente suspensiones de heces libres de partículas (ver punto 9.3., Preparación de las muestras). Verificar asimismo que se ha aspirado completamente el líquido en cada paso de lavado.**

#### 9.6. Segunda incubación

Pipetear 100 µl de conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina **Conjugate 2** en los pocillos e incubar a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 30 min.

#### 9.7. Lavado

Lavar según se ha descrito en el punto 9.5.

#### 9.8. Tercera incubación

Llenar todos los pocillos con 100 µl de sustrato **Substrate**. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 15 minutos en la cámara oscura. A continuación, llenar todos los pocillos con 50 µl de reactivo de parada **Stop** con objeto de detener la reacción. Después de mezclar con precaución golpeando suavemente contra un lado de la placa, medir la extinción a 450 nm (opcionalmente a 450/620 nm). Ajustar el punto cero en el aire, es decir, sin la placa de pocillos.

#### **Nota:**

En las muestras de pacientes con positivo alto pueden formarse precipitados de sustrato de color negro.

### **10. Control de calidad, información sobre caducidad de reactivos**

A efectos de control de calidad, deben utilizarse controles positivos y negativos cada vez que se realice el ensayo con objeto de garantizar que los reactivos son estables y que el ensayo se ha realizado correctamente. El ensayo se habrá realizado correctamente si la tasa de extinción (DO) de control negativo es menor que 0,2 a 450 nm (menor que 0,160 a 450/620 nm) y el valor medido para el control positivo es mayor que 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valor mayor que 0,2 (0,160) para el control negativo puede indicar que el lavado no ha sido suficiente. Las desviaciones de los valores requeridos, como turbidez o coloración azul del sustrato incoloro antes de introducirlo en los pocillos, puede indicar que los reactivos han caducado.

Si no se cumplen los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Procedimiento de ensayo correcto
- Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas; no utilizar soluciones de sustrato que hayan virado a color azul.

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consultar al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

## 11. Evaluación e interpretación

### 11.1. Cálculo del corte

Con objeto de establecer el corte, se añaden 0,15 unidades de extinción a la extinción medida para el control negativo.

$$\text{Corte} = \text{extinción del control negativo} + 0,15$$

### 11.2. Resultados del ensayo

La evaluación de la muestra es **positiva** si la tasa de extinción supera en más del 10 % el valor de corte calculado.

La evaluación de la muestra es **marginal** si la tasa de extinción está dentro de un rango 10 % menor a 10 % mayor que el valor de corte. Si la repetición de la prueba de una muestra de heces fresca cae nuevamente dentro de la zona gris, la evaluación de la muestra es negativa.

Las muestras con extinciones inferiores en más del 10 % al valor de corte calculado deben considerarse **negativas**.

## 12. Limitaciones del método

El test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin detecta la presencia de enterotoxina de *Clostridium perfringens* en muestras de heces. El nivel de extinción determinado no puede asociarse a la presencia o gravedad de los síntomas clínicos. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro y los síntomas clínicos.

Un resultado **positivo** no permite descartar la presencia de otros patógenos infecciosos.

Un resultado **negativo** no permite descartar la posibilidad de infección con *Clostridium perfringens*. El resultado puede estar provocado por la descomposición proteolítica de enterotoxinas en la muestra debido a condiciones de almacenaje indebidas. Si la historia del paciente da pie a sospechar una infección con *Clostridium perfringens* deberá repetirse la

prueba con una muestra de heces diferente.

Un resultado **marginal** puede deberse a la distribución no homogénea de las toxinas en la muestra de heces. En este caso, deberá repetirse la prueba con una segunda suspensión de la misma muestra o solicitarse una nueva muestra.

### 13. Rendimientos

#### 13.1. Comparación de métodos de determinación del límite de detección

Para establecer el límite de detección, se tituló una solución madre de la enterotoxina (10 µg/ml) en cada tampón de dilución de muestra relevante y se aplicó en un test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin y en un ELISA comercial de la competencia. Las concentraciones de toxina de ambos ELISA se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Comparación de dos ensayos ELISA para la identificación de enterotoxina de *Clostridium perfringens*.

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

El ELISA RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin puede detectar 0,04 ng/ml de enterotoxina pura y es, por tanto, 60 veces más sensible que el ELISA comercial de la competencia.

#### 13.2. Reactividad cruzada

Se analizaron diferentes microorganismos patógenos del tracto intestinal mediante el ELISA RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin sin que se observase reactividad cruzada. Estas pruebas se realizaron con suspensiones bacterianas ( $10^6$  a  $10^9$  ufc/ml), cultivos de parásitos ( $10^7$  a  $10^9$  organismos/ml) y con sobrenadantes de cultivos de células infectadas con virus. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Reactividad cruzada con microorganismos patógenos del tracto intestinal

Organismo	Resultado [DO 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. Precisión

La reproducibilidad del test RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin se investigó con seis referencias representativas del rango de medida completo, desde débil a positivo alto. Para determinar la reproducibilidad intraensayo se analizaron 40 réplicas de estas referencias. Se determinaron las medias y los coeficientes de variación (CV) para tres lotes del kit. Para la reproducibilidad interensayo se analizaron referencias en forma de duplicados de diez días de trabajo diferentes, con dos ensayos por día. Las medidas fueron determinadas por dos técnicos sobre tres lotes. Se determinó la reproducibilidad entre lotes para los tres lotes de kits.

Referencia Media/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
	Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lotes kit 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. Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias no demostraron tener efectos en los resultados del ensayo al mezclarlas con muestras de heces positivas y negativas para enterotoxina de *Clostridium perfringens* en las concentraciones descritas: sulfato de bario (5% p/p), loperamida (antidiarreico; 5% p/p), Pepto-Bismol (antidiarreico, 5% v/p), mucinas (5% p/p), ciclamato (edulcorante, 5% v/p), sangre humana (5% v/p), ácido esteárico y ácido palmítico (mezcla 1:1, 40% p/p), metronidazol (0,5) (antibiótico 5% v/p), diclofenaco (0,00263% v/p).

## Anexo

Símbolos específicos del ensayo:

Plate	Placa de pocillos
Diluent   1	Tampón de dilución de muestra
Wash	Tampón de lavado
Control   +	Control positivo
Control   -	Control negativo
Conjugate   1	Conjugado 1
Conjugate   2	Conjugado 2
Substrate	Sustrato
Stop	Reactivo de parada

## Bibliografía

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*  $\alpha$ -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)