

# RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin

Codice prodotto: C0601



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

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



## 1. Campo di applicazione

Per uso diagnostico *in vitro*. Il test immunoenzimatico RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin consente la rilevazione qualitativa di enterotossina *Clostridium perfringens* in campioni di feci umane.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

I batteri *Clostridium perfringens*, analogamente a tutti gli altri clostridi, sono batteri anaerobi, gram-positivi, ubiquitari che producono spore normalmente presenti nella flora dell'intestino crasso umano. Si differenziano dagli altri clostridi in quanto mancano dei flagelli peritrichi. Si distinguono cinque ceppi di *Clostridium perfringens*, dal Tipo A al Tipo E. Il ceppo di Tipo A è quello più importante per l'uomo, insieme al Tipo C, ed è causa di enterite necrotica, in determinate condizioni (dieta, deficit di tripsina), mentre tutti gli altri cinque tipi vengono rilevati negli animali.

Questi gruppi sono classificati in base alla produzione di quattro tossine principali (alfa, beta, epsilon, iota), tutte con effetti citotossici e necrotizzanti. Oltre a queste quattro tossine principali, determinati ceppi di *C. perfringens* producono una serie di altre tossine, tra cui l'enterotossina (un polipeptide dal peso di 35 kDa), patogena per l'uomo.

Con il consumo di cibi non adeguatamente conservati e in particolare di cibi precotti, può verificarsi un consumo significativo di *C. perfringens*. Questi, a loro volta, formano grandi quantità di enterotossine *C. perfringens* (CPE), che costituiscono la causa di malattie intestinali caratterizzate da diarrea e crampi allo stomaco. La sintomatologia clinica compare circa 8 - 24 ore dopo l'assunzione di cibo contaminato e recede dopo circa ulteriori 24 ore. Vomito, febbre e cefalea accompagnano raramente la malattia. Oltre all'avvelenamento alimentare, il *C. perfringens* causa circa il 10% di tutti i casi di diarrea associata ad antibiotici (AAD) e il 5 - 20 % dei casi di diarrea sporadica (SPOR) non causati da avvelenamento alimentare. Questa forma di diarrea si estende fino alla colite pseudomembranosa (PMC) con decorsi molto più severi e prolungati (10 – 30 giorni), spesso con presenza di sangue e muco nelle feci. All'esame istologico delle biopsie prelevate da sezioni inferiori dell'intestino crasso e del retto, si rilevano aree edematose provenienti da lesioni causate da CPE.

Indagini recenti hanno dimostrato che il codice dell'enterotossina può essere cromosomico (avvelenamento alimentare) e può essere episomale (nella AAD e nella SPOR).

Il test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin è disponibile in parallelo al test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B Test e offre un importante sistema di identificazione per la chiarificazione delle cause di diarrea associata ad antibiotici e diarrea sporadica. Questo strumento, che consente una diagnosi rapida e affidabile, è un ausilio prezioso nel processo di decisione del trattamento.

### 3. Principio del test

Il test RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin utilizza anticorpi specifici in un metodo a sandwich. Anticorpi monoclonali agli epitopi dell'enterotossina *C. perfringens* vengono legati alla superficie dei pozzetti della piastra di microtitolazione. Una sospensione del campione di feci da esaminare e i controlli vengono introdotti nel pozzetto della piastra per microtitolazione insieme ad anticorpi anti-enterotossina biotinilati (Coniugato 1) mediante pipetta a temperatura ambiente (20 - 25 °C) per l'incubazione. Dopo il lavaggio aggiungere il poli-coniugato streptavidina-perossidasi (Coniugato 2) e incubare nuovamente a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Quando viene rilevata presenza di enterotossine in un campione, si forma un complesso a sandwich composto dagli anticorpi immobilizzati, dalle enterotossine e dagli anticorpi coniugati. Un altro lavaggio rimuove il poli-coniugato streptavidina-perossidasi non legato. Nei campioni positivi, l'aggiunta di un substrato trasforma l'enzima legato da una soluzione incolore in una soluzione blu. L'aggiunta di un reagente bloccante causa una variazione cromatica da blu a giallo. L'estinzione è proporzionale alla concentrazione di CPE presenti nel campione.

### 4. Reagenti forniti

I reagenti nel kit sono sufficienti per 96 determinazioni.

Plate	96	Piastra per microtitolazione, 12 strisce di micropozzetti (divisibili) in telaio di fissaggio, rivestita con anticorpi monoclonali specifici per le enterotossine <i>Clostridium perfringens</i>
Diluent   1	100 ml	Tampone di diluizione del campione, soluzione proteica tamponata NaCl; pronto per l'uso, colorazione in blu
Wash	100 ml	Tampone di lavaggio, soluzione tamponata al fosfato NaCl (concentrata 10 volte); contiene 0,1% di Thimerosal
Control   +	2 ml	Controllo positivo; enterotossina inattivata, pronto per l'uso
Control   -	2 ml	Controllo negativo (tampone di diluizione dei campioni); pronto per l'uso
Conjugate   1	13 ml	Anticorpi anti-enterotossina coniugati in biotina in soluzione proteica stabilizzata; pronto per l'uso; colorazione in blu
Conjugate   2	13 ml	Poli-coniugato streptavidina-perossidasi in soluzione proteica tamponata; pronto per l'uso, colorazione in arancione
Substrate	13 ml	Perossido di idrogeno/TMB; pronto per l'uso
Stop	12 ml	Reagente di bloccaggio; acido solforico 1 N; pronto per l'uso

## 5. Reagenti e loro conservazione

Tutti i reagenti devono essere conservati a 2 - 8 °C e possono essere utilizzati fino alla data stampata sull'etichetta. Il tampone di lavaggio diluito è conservabile per 4 settimane ad una temperatura compresa tra 2 - 8 °C. Evitare la contaminazione microbica. Dopo la data di scadenza, non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità.

La busta in alluminio deve essere aperta con le forbici, in modo tale da non rimuovere la chiusura a clip. Le strisce di microtitolazione inutilizzate devono essere immediatamente riposte nella busta in alluminio e conservate a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.

Evitare l'esposizione diretta alla luce del substrato incolore, per evitare la decomposizione o la colorazione blu per auto-ossidazione. Un substrato che sia diventato blu non deve essere utilizzato.

## 6. Reagenti aggiuntivi necessari – attrezzatura richiesta

### 6.1. Reagenti forniti

- Acqua distillata o deionizzata

### 6.2. Attrezzatura

- Provette
- Pipette monouso (Codice articolo: Z0001)
- Vorticolatore (opzionale, vedere Punto 9.3.)
- Micropipetta da 50 - 100 µl e 1 ml in volume
- Cilindro graduato (1.000 ml)
- Cronometro
- Dispositivo di lavaggio per piastre per microtitolazione o pipette multicanale (300 µl)
- Fotometro per piastre per microtitolazione (450 nm e filtro di riferimento 620 - 650 nm)
- Carta filtrante (carta da laboratorio)
- Contenitore per rifiuti

## 7. Precauzioni per gli utilizzatori

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso nell'esecuzione del test.

Non introdurre con la bocca campioni o reagenti mediante pipetta, evitare il contatto con la cute lesa o con le mucose. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e lavare le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

Per maggiori informazioni consultare la Scheda di sicurezza dei materiali (MSDS) all'indirizzo [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com). Il kit include un controllo positivo che contiene l'enterotossina inattivata. Analogamente ai campioni di feci, deve essere trattato come materiale potenzialmente infettivo e maneggiato nel rispetto delle disposizioni di sicurezza corrispondenti.

Il tampone di lavaggio contiene 0,1 % di Thimerosal come conservante. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la cute o le membrane mucose.

Garantire uno smaltimento idoneo e responsabile di tutti i reagenti e i materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

## 8. Raccolta e conservazione dei campioni

Fino all'uso, conservare il materiale di test a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Qualora il materiale non possa essere utilizzato per un test entro tre giorni, si raccomanda di conservarlo a una temperatura di -20 °C o inferiore. Evitare il ripetuto congelamento e scongelamento del campione. Dopo la diluizione in tampone 1:11, il campione può essere conservato a 4 °C e dovrà essere utilizzato entro sette giorni.

I campioni di feci e i prelievi rettali non devono essere riposti in contenitori per il trasporto contenenti sostanze per il trasporto come conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti e detergenti, in quanto potrebbero crearsi interferenze con il test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin. Nel test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin possono essere utilizzati campioni di feci racchiusi negli usuali mezzi di trasporto presenti in commercio (Cary Blair, Amies). Tuttavia, occorre tenere conto della necessaria prediluizione del campione. Se possibile, la diluizione finale del campione di feci nel diluente Diluent 1 dovrebbe essere 1:11.

Se vengono usati prelievi rettali, assicurarsi che il volume del materiale fecale sia sufficiente (circa 100 mg) per il test.

Le indagini ambientali devono includere anche campioni di feci prelevati da persone che non mostrano sintomi clinici al fine di identificare i portatori asintomatici.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Informazioni generali

Tutti i reagenti e la piastra di microtitolazione **Plate** devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25 °C) prima dell'uso. Le strisce per microtitolazione devono essere rimosse dalla busta in alluminio solo dopo il raggiungimento della temperatura ambiente. Mescolare con cura i reagenti immediatamente prima dell'utilizzo. Dopo l'uso, le strisce di micropozzetti (inserite in buste sigillate) e i reagenti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Una volta usate, le strisce di micropozzetti non devono essere riutilizzate. I reagenti

e le strisce per microtitolazione non devono essere utilizzati se l'imballaggio è danneggiato o i flaconi non sono ermetici.

Evitare il contatto diretto dei campioni con i componenti del kit per evitare la contaminazione incrociata.

Il test non deve essere esposto all'irradiazione solare diretta. Si raccomanda di coprire la piastra per microtitolazione o di sigillarla con una pellicola in plastica per evitare la perdita per evaporazione.

## 9.2. Preparazione del tampone di lavaggio

Miscelare 1 parte di concentrato di tampone di lavaggio **Wash** con 9 parti di acqua distillata. Eventuali cristalli presenti nel concentrato devono essere precedentemente riscaldati in un bagnomaria a 37 °C per scioglierli.

## 9.3. Preparazione dei campioni

Introdurre in una provetta marcata 1 ml di tampone per diluizione dei campioni RIDASCREEN® **Diluent | 1**. Utilizzare una pipetta monouso (codice prodotto Z0001) per aspirare un campione di feci liquide (circa 100 µl) fino a superare di poco la seconda graduazione e aggiungerlo al tampone nella provetta per ottenere una sospensione. Per realizzare una sospensione con un campioni di feci solide, introdurre una quantità equivalente (circa 100 mg) con una spatola o un'ansa di inoculazione monouso.

Omogeneizzare la sospensione fecale mediante aspirazione ed espulsione tramite pipetta monouso oppure, in alternativa, miscelare in un vorticolatore. Lasciare riposare la sospensione per un breve periodo affinché le particelle di feci più grandi possano depositarsi, quindi il supernatante di sospensioni di feci purificato è pronto per essere utilizzato direttamente nel test. Se la procedura viene eseguita in un sistema ELISA automatico, il supernatante non deve contenere particelle. In questo caso, è consigliabile centrifugare il campione a 2.500 G per 5 minuti.

### **Nota:**

I campioni di feci diluiti in **Diluent | 1** possono essere utilizzati in qualsiasi altro test RIDASCREEN® ELISA a condizione che anche questo impieghi il diluente **Diluent | 1**.

## 9.4. Prima incubazione

Dopo aver inserito un numero sufficiente di pozzetti nel telaio di fissaggio, introdurre 100 µl di controllo positivo **Control | +**, controllo negativo **Control | -** o sospensione di feci. Quindi aggiungere 100 µl dell'anticorpo biotina-coniugato **Conjugate | 1** e miscelare (dando dei leggeri colpi sul bordo della piastra); successivamente incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

## 9.5. Lavaggio

Un accurato lavaggio è importante per ottenere i giusti risultati e deve pertanto essere effettuato in stretta conformità con le istruzioni. Il prodotto di incubazione dei pozzetti deve essere svuotato in un contenitore per rifiuti per poi essere smaltito nel rispetto delle normative ufficiali. Quindi capovolgere la piastra su carta assorbente e picchiettare per rimuovere l'umidità residua. Lavare la piastra cinque volte utilizzando 300 µl di lampone di lavaggio ogni volta. Assicurarsi che i pozzetti vengano completamente svuotati estroflettendoli tamponandoli dopo ciascun lavaggio su un'area di carta assorbente ancora asciutta e inutilizzata.

**Se si utilizza una lavatrice per micropiastre o un sistema ELISA completamente automatico, assicurarsi che la macchina sia correttamente regolata e, se necessario, chiedere le impostazioni al produttore.**

**I dispositivi forniti da R-Biopharm sono già programmati con le impostazioni e i protocolli di lavoro convalidati. Per evitare di bloccare gli aghi di lavaggio, introdurre solo sospensioni di feci prive di particelle (vedere Punto 9.3., Preparazione dei campioni). Inoltre, assicurarsi che tutto il liquido venga aspirato in ogni fase di lavaggio.**

## 9.6. Seconda incubazione

Utilizzare una pipetta per introdurre 100 µl di poli-coniugato streptavidina-perossidasi **Conjugate | 2** nei campioni, quindi incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

## 9.7. Lavaggio

Lavare come descritto al Punto 9.5.

## 9.8. Terza incubazione

Iniettare nei pozzetti 100 µl di substrato **Substrate**. Quindi incubare la piastra per 15 minuti al buio a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Successivamente inserire in tutti i pozzetti 50 µl di reagente bloccante **Stop** per arrestare la reazione. Dopo aver accuratamente miscelato picchiettando leggermente sul lato della piastra, misurare l'estinzione a 450 nm (opzionale: 450/620 nm). Regolare il punto zero contro aria, ovvero senza la piastra per microtitolazione.

### **Nota:**

I campioni di pazienti altamente positivi possono causare precipitati nerastri del substrato.

## 10. Controllo della qualità – indicazioni della scadenza dei reagenti

Per il controllo della qualità eseguire il controllo positivo e negativo ad ogni esecuzione del test, per garantire la corretta esecuzione del test e la stabilità dei reagenti. Il test è eseguito correttamente se il tasso di estinzione (OD) del controllo negativo è inferiore a 0,2 a 450 nm (inferiore a 0,160 a 450/620 nm) e il valore misurazione del controllo positivo è superiore a 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valore superiore a 0,2 (0,160) per il controllo negativo può

indicare un lavaggio insufficiente. La deviazione dai valori richiesti, proprio come un'opacizzazione o una colorazione blu del substrato incolore prima dell'inserimento nei pozzetti, può indicare che i reagenti sono scaduti.

Se i valori stipulati non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata (p.es. calibrazione)
- Procedura di esecuzione del test corretta
- Controllare visivamente che i componenti del kit non presentino contaminazione o perdite; non utilizzare una soluzione di substrato che sia diventata blu.

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, rivolgersi al produttore o al proprio distributore R-Biopharm locale.

## 11. Valutazione e interpretazione

### 11.1. Calcolo del valore limite

Per stabilire il valore limite, introdurre 0,15 unità di estinzione all'estinzione misurata per il controllo negativo.

Valore limite = estinzione per il controllo negativo + 0,15

### 11.2. Risultati del test

Il campione è considerato **positivo** se il tasso di estinzione supera il valore limite calcolato di più del 10 %.

Il campione viene considerato **marginale** se il tasso di estinzione è compreso tra 10 % in meno e 10 % in più rispetto al valore limite. Se l'esame ripetuto con un campione di feci fresco rientra ancora nella zona grigia, il campione viene considerato negativo.

I campioni con estinzioni superiori al 10 % al di sotto del limite calcolato devono essere considerati **negativi**.

## 12. Limiti del metodo

Il test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin identifica l'enterotossina di *Clostridium perfringens* nei campioni di feci. Non è possibile stabilire una relazione tra il livello di estinzione rilevato e l'insorgenza o la gravità della sintomatologia clinica. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati tenendo conto dei segni e dei sintomi clinici.

Un risultato **positivo** non esclude la presenza di altri patogeni infettivi.



Un risultato **negativo** non esclude la possibilità di infezione da *Clostridium perfringens*. Il risultato può essere prodotto dalla decomposizione proteolitica delle enterotossine nel campione in seguito a condizioni di conservazione insoddisfacenti. Qualora a livello anamnestico sussista il sospetto di infezione da *Clostridium perfringens*, l'esame deve essere ripetuto con un altro campione di feci.

Un risultato **marginale** può essere dovuto a distribuzione non omogenea delle tossine nel campione di feci. In questo caso, l'esame deve essere ripetuto con una seconda sospensione dallo stesso campione o in alternativa dovrà essere richiesto un altro campione di feci.

### 13. Prestazioni e caratteristiche

#### 13.1. Confronto tra i metodi per il limite di rilevazione

Al fine di individuare il limite di rilevazione, una soluzione stock dell'enterotossina (10 µg/ml) è stata titolata in ogni in tampone di soluzione campione corrispondente e quindi applicata in un test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin nonché nel test ELISA di un concorrente disponibile in commercio. Le concentrazioni di tossina in entrambi i risultati ELISA sono presentati nella Tabella 1.

Tabella 1: Confronto dei due test ELISA per l'identificazione dell'enterotossina *Clostridium perfringens*.

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

Il test ELISA RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin è in grado di rilevare 0,04 ng/ml di enterotossina pura ed è pertanto 60 volte più sensibile del test ELISA del concorrente disponibile in commercio.

#### 13.2. Reattività incrociata

Diversi microrganismi patogeni del tratto intestinale sono stati esaminati con il test ELISA RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin e non è stata rilevata cross-reattività. Questi test sono stati condotti con sospensioni batteriche (da 10<sup>6</sup> a 10<sup>9</sup> cfu/ml), con colture parassitarie (da 10<sup>7</sup> a 10<sup>9</sup> organismi/ml) e con supernatanti colturali di cellule infettate da virus. I risultati di questo studio sono riepilogati nella Tabella 2.

Tabella 2: Reazioni incrociate con microrganismi patogeni del tratto intestinale

Organismo	Risultato [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 bifirmentans</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. Precisione

La riproducibilità del test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin è stata verificata su sei riferimenti che rappresentano l'intero range di misurazione da debolmente ad altamente positivo. Per la determinazione della riproducibilità intra-analisi, sono stati esaminati 40 replicati di questi riferimenti. Sono stati determinati i valori medi e i coefficienti di variazione (CV) per tre lotti di kit. Per la riproducibilità inter-analisi, le misurazioni dei riferimenti sono state eseguite in 10 giorni lavorativi diversi con 2 serie al giorno con test doppi. Le misurazioni sono state determinate in tre lotti di kit da tre tecnici. La riproducibilità inter-lotto è stata determinata per tutti e tre i lotti di kit.

Riferimento Valore medio / CV	Intra-analisi			Inter-analisi			Inter- lotto
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti 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. Sostanze interferenti

Le sostanze incluse nell'elenco seguente non hanno mostrato effetti sui risultati dei test quando miscelate in campioni di feci positivi e negativi *Clostridium perfringens* nelle concentrazioni descritte: solfato di bario (5% w/w), loperamide (antidiarroico; 5% w/w), Peptobismol (antidiarroico, 5% v/w), mucine (5% w/w), ciclamato (edulcorante artificiale, 5% v/w), sangue umano (5% v/w), acido stearico e acido palmitico (miscela 1:1, 40% w/w), metronidazolo (0,5) (antibiotico 5% v/w), diclofenac (0,00263% v/w).

## Appendice

Simboli specifici del test:

Plate	Piastra per microtitolazione:
Diluent   1	Tampone di diluizione del campione
Wash	Tampone di lavaggio
Control   +	Controllo positivo
Control   -	Controllo negativo
Conjugate   1	Coniugato 1
Conjugate   2	Coniugato 2
Substrate	Substrato
Stop	Reagente bloccante

## Letteratura

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)