

RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin

No do artigo: C0601



R-Biopharm AG An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemanha
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20



1. Uso previsto

Para uso no diagnóstico *in vitro*. O ensaio imunoenzimático RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin fornece a identificação qualitativa de enterotoxinas de *Clostridium perfringens* em amostras de fezes humanas.

2. Resumo e explicação do teste

A bactéria *Clostridium perfringens* como todos os outros clostrídios, são bactérias anaeróbicas, formadoras de esporos, onipresentes, Gram-positivas, que são regularmente encontradas entre a flora do intestino grosso em humanos. Elas diferem das outras espécies de clostrídios, porque lhes falta os flagelos peritricosos. Cinco cepas de *Clostridium perfringens* se distinguem como tipos A a E. A cepa do tipo A tem a maior importância para os seres humanos, juntamente com o tipo C, a causa de enterite necrótica, sob certas condições (dieta, deficiência de tripsina), enquanto que todos os cinco tipos são vistos em animais.

Estes grupos são classificados de acordo com a produção de quatro toxinas principais (Alfa, Beta, Epsilon, Iota), os quais têm efeitos citotóxicos e necrotizantes. Além destas quatro principais toxinas, certas cepas de *C. perfringens* produzem um número de outras toxinas, entre as quais a enterotoxina (um polipeptídeo de 35 kDa em tamanho) é de importância patogênica para humanos.

Com o consumo de alimentos armazenados de forma inadequada, e alimentos pré-cozidos, em especial, a *C. perfringens* pode ser absorvida em grandes quantidades. Elas, por sua vez, formam grandes quantidades de enterotoxinas de *C. perfringens* (CPE) e estas são a causa de doenças intestinais com diarreia e cólicas estomacais. Os sinais e sintomas começam cerca de 8 - 24 horas após a ingestão de alimentos contaminados, e eles retrocedem após mais de 24 horas. Vômitos, febre e dor de cabeça raramente acompanham a doença. Além da intoxicação alimentar, *C. perfringens* provoca cerca de 10% de todos os casos de diarreia associada a antibióticos (DAA), bem como 5-20% dos casos de diarreia esporádica (SPOR) que não são causadas por intoxicação alimentar. Esta forma de diarreia varia tanto quanto a colite pseudomembranosa (PMC), com tratamentos da doença que são muito mais graves e de maior duração (10-30 dias), muitas vezes com presença de sangue e muco nas fezes. No exame histológico de biópsias de seções inferiores do intestino grosso e do reto, encontram-se áreas edematosas decorrentes das lesões causadas pela CPE.

Investigações recentes mostraram que o código de enterotoxina pode ser cromossômico (intoxicação alimentar) e pode ser episomal (em DAA e SPOR).

O Teste RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin está disponível paralelamente ao Teste de Toxina A/B de Clostridium difficile RIDASCREEN®, fornecendo um sistema de identificação significativo para o esclarecimento das causas da diarreia associada a antibióticos e da diarreia esporádica. Permitindo o diagnóstico rápido e confiável, esta ferramenta é uma ajuda valiosa no processo de decisão de tratamento.

3. Princípio do teste

O teste RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin emprega anticorpos específicos em um método do tipo sanduíche. Anticorpos monoclonais para epítomos da enterotoxina da *C. perfringens* estão ligados à superfície do poço da placa de micropoços. Usa-se uma pipeta para posicionar uma suspensão da amostra de fezes para ser examinada, bem como as amostras de controle no poço da placa de micropoços, juntamente com anticorpos contra enterotoxinas biotinados (Conjugado 1) para incubação à temperatura ambiente (20 - 25 °C). Depois de uma etapa de lavagem, o conjugado de estreptavidina poli-peroxidase (Conjugado 2) é adicionado e incubado novamente à temperatura ambiente (20 - 25 °C). Se há enterotoxinas em uma amostra, os anticorpos imobilizados, as enterotoxinas e os anticorpos conjugados formam um complexo de sanduíche. Outra etapa de lavagem remove o conjugado de estreptavidina poli-peroxidase não ligado. Em amostras positivas, a adição de um substrato muda a enzima ligada, de uma solução incolor para uma solução azul. A adição de um reagente de parada muda a cor de azul para amarelo. A extinção é proporcional à concentração de CPE encontradas na amostra.

4. Reagentes fornecidos

Os reagentes do kit são suficientes para 96 determinações.

Plate	96	Placa de micropoços, 12 tiras de micropoços (que podem ser divididas) no suporte para tiras; revestida com anticorpos monoclonais específicos para a enterotoxina de <i>Clostridium perfringens</i>
Diluent 1	100 ml	Tampão de diluição da amostra, solução de NaCl tamponada com proteína, pronto para usar, cor azul
Wash	100 ml	Tampão de lavagem, solução de NaCl tamponada com fosfato (concentrada 10 vezes); contém 0,1% de timerosal
Control +	2 ml	Controle positivo; enterotoxina inativada; pronto para usar
Control -	2 ml	Controle negativo (tampão de diluição da amostra); pronto para usar
Conjugate 1	13 ml	Anticorpos de enterotoxina conjugados à biotina em solução de proteína estabilizada; prontos para usar, cor azul
Conjugate 2	13 ml	Conjugado de estreptavidina poli-peroxidase em uma solução de proteína estabilizada; pronto para usar; cor laranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrogênio/TMB; pronto para usar
Stop	12 ml	Reagente de parada; 1 N de ácido sulfúrico; pronto para usar

5. Reagentes e sua armazenagem

Todos os reagentes devem ser armazenados a 2 - 8 °C e podem ser usados até a data impressa na etiqueta. Armazenado a 2 - 8 °C, o tampão de lavagem diluído pode ser usado por, no máximo, 4 semanas. Deve-se evitar a contaminação microbiana. Após a data de expiração, a garantia da qualidade já não é válida.

A bolsa de alumínio deve ser aberta com tesoura de forma que a vedação de grampo não seja rasgada. As tiras de micropoços que não forem necessárias devem ser colocadas em uma bolsa de alumínio imediatamente e armazenadas a 2 - 8 °C.

O substrato incolor também deve ser protegido contra a luz solar direta, para impedir que se decomponha ou fique azul devido à auto-oxidação. Depois que o substrato fica azul, ele não pode mais ser utilizado.

6. Reagentes adicionais necessários – e equipamento necessário

6.1. Reagentes fornecidos

- Água destilada ou deionizada

6.2. Equipamento

- Tubos de ensaio
- Pipetas descartáveis (Artigo no: Z0001)
- Misturador de vórtice (opcional, consulte 9.3.)
- Micropipeta para volumes de 50 - 100 µl e 1 ml
- Cilindro de medição (1.000 ml)
- Cronômetro
- Dispositivo de lavagem para placas de micropoços ou pipetas multicanal (300 µl)
- Fotômetro para placas de micropoços (450 nm e filtro de referência de 620 - 650 nm)
- Papel filtro (toalhas para laboratório)
- Recipiente de resíduos

7. Precauções de uso

Somente para uso no diagnóstico *in vitro*.

Este ensaio só deve ser realizado por profissionais de laboratório treinados. As diretrizes para trabalhar em laboratórios médicos devem ser seguidas. Sempre siga rigorosamente as instruções para os usuários referentes a este teste.

As amostras ou reagentes não devem ser pipetados com a boca, e o contato com a pele ferida ou com membranas mucosas deve ser evitado. Use equipamento de proteção pessoal (luvas adequadas, avental, óculos de segurança) ao manusear as amostras e lave as mãos depois de

concluir o teste. Não fume, coma ou beba nas áreas onde amostras ou reagentes estão sendo processados.

Para ver mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com. O kit inclui um controle positivo que contém a enterotoxina inativada. Assim como as amostras de fezes, este kit deve ser tratado como material potencialmente infeccioso e manuseado de acordo com as normas de segurança relevantes.

O tampão de lavagem contém 0,1% de timerosal como conservante. Não se deve permitir que essa substância entre em contato com a pele ou membranas mucosas.

Garanta o descarte adequado e responsável de todos os reagentes e materiais após o uso. Para o descarte, siga os regulamentos nacionais.

8. Coleta e armazenagem de amostras

Até o momento da utilização, armazene o material de teste a 2 - 8 °C. Se não for possível usar o material para um teste dentro de três dias, recomendamos a armazenagem a -20 °C ou menos. Evite congelar e descongelar a amostra repetidamente. Depois de diluir uma amostra de fezes no tampão de diluição de amostra 1:11, ela pode ser armazenada a 4 °C para uso dentro de sete dias.

As amostras de fezes não devem ser coletadas em contêineres de transporte contendo meios conservantes, soros animais, íons metálicos, agentes oxidantes ou detergentes, já que podem interferir no teste RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin. As amostras de fezes embaladas nos meios de transporte normalmente comercializados (Cary Blair, Amies) podem ser usadas no teste RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin. No entanto, a pré-diluição aqui requerida da amostra deve ser levada em conta. Na medida do possível, a diluição final da amostra de fezes em Diluent 1 deve ser precisamente 1:11.

Se esfregaços retais forem utilizados, certifique-se de que o volume de material fecal seja suficiente (aprox. 100 mg) para o teste.

O rastreio do contato deve incluir amostras de fezes tomadas de pessoas de contato que não apresentam sintomas clínicos, para identificar portadores assintomáticos.

9. Procedimentos do teste

9.1. Informações gerais

Todos os reagentes e o micropoço **Plate** devem atingir a temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes do uso. As tiras de micropoços não devem ser removidas da bolsa de alumínio até atingir a temperatura ambiente. Os reagentes devem ser misturados totalmente imediatamente antes do uso. Depois do uso, as tiras de micropoços (colocadas em bolsas vedadas) e os reagentes devem ser armazenados de novo a 2 - 8 °C. Depois de usadas, as tiras de micropoços não

podem ser usadas novamente. Os reagentes e as tiras de micropoços não devem ser usados se a embalagem estiver danificada ou os frascos estiverem vazando.

Para evitar a contaminação cruzada, deve-se impedir que as amostras entrem em contato com os componentes do kit.

O teste não deve ser realizado sob luz solar direta. Recomendamos a cobertura da tira de micropoços ou o envolvimento em plástico para evitar perdas por evaporação.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

Misture 1 parte de concentrado de tampão de lavagem **Wash** com 9 partes de água destilada. Quaisquer cristais presentes no concentrado deverão ser dissolvidos previamente aquecendo em banho-maria a 37 °C.

9.3 Preparação das amostras

Encha um tubo de ensaio com 1 ml de tampão de diluição de amostra RIDASCREEN® Diluent | 1. Use uma pipeta descartável (artigo no Z0001) para aspirar uma amostra fina de fezes (aprox. 100 µl) até um ponto logo acima da segunda marcação e adicione ao tampão no tubo de ensaio para fazer uma suspensão. Para fazer uma suspensão com uma amostra de fezes sólidas, adicione uma quantidade equivalente (100 mg) com uma espátula ou ansa de inoculação descartável.

Homogeneíze a suspensão de fezes por sucção e ejeção com uma pipeta ou, como alternativa, misture com um misturador Vortex. Deixe a suspensão descansar por um breve período para que as partículas grossas de fezes assentem, e esse sobrenadante clarificado da suspensão de fezes pode ser usado diretamente no teste. Caso o procedimento do teste seja realizado em um sistema ELISA automatizado, o sobrenadante deve obrigatoriamente estar livre de partículas. Nesse caso, é recomendável centrifugar a amostra a 2.500 G durante 5 minutos.

Observação:

Amostras de fezes diluídas em **Diluent | 1** podem ser usadas em outro teste RIDASCREEN® |, desde que ele também utilize o **Diluent | 1**.

9.4. Primeira incubação

Depois de inserir um número suficiente de poços no suporte para tiras, use uma pipeta para adicionar 100 µl do positivo **Control | +**, do negativo **Control | -**, ou da suspensão da amostra das fezes aos poços. Em seguida, adicione 100 µl do anticorpo conjugado à biotina **Conjugate | 1** e misture (batendo levemente no lado da placa); depois, incube por 60 minutos à temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.5. Lavagem

Lavar cuidadosamente é importante para a obtenção de resultados corretos. Portanto, siga rigorosamente as instruções. A substância incubada nos poços deve ser esvaziada em um contêiner de resíduos para o descarte de acordo com os requisitos oficiais. Em seguida, gire a

placa em direção ao papel absorvente e bata para remover a umidade residual. Em seguida, lave a placa cinco vezes usando 300 µl de tampão de lavagem em cada vez. Certifique-se de que os poços sejam totalmente esvaziados, deitando-os, após cada lavagem, em uma parte do papel absorvente que ainda esteja seca e não tenha sido usada.

Se você usa uma lavadora de microplacas ou um ELISA totalmente automatizado, certifique-se de que a máquina esteja ajustada corretamente; se necessário, solicite os ajustes do fabricante.

Os aparelhos fornecidos pela R-Biopharm já estão programados com ajustes e protocolos de controle validados. Para evitar o entupimento das agulhas de lavagem, entregue somente suspensões de fezes livres de partícula (consulte o Item 9.3., Preparação das amostras). Além disso, certifique-se de que todo o líquido seja aspirado durante cada etapa de lavagem.

9.6. Segunda incubação

Use uma pipeta para colocar 100 µl de conjugado de estreptavidina poli-peroxidase **Conjugate | 2** nos poços e, em seguida, incube durante 30 minutos à temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.7. Lavagem

Lave conforme o descrito no Item 9.5.

9.8. Terceira incubação

Encha todos os poços com 100 µl de substrato **Substrate**. Incube a placa por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente (20 - 25 °C). Em seguida, coloque 50 µl de reagente de parada em todos os poços **Stop** a fim de parar a reação. Depois de misturar cuidadosamente ao bater levemente no lado da placa, meça a extinção a 450 nm (opcional: 450/620 nm). Ajuste o ponto zero no ar, ou seja, sem a placa de micropoços.

Observação:

Amostras altamente positivas de pacientes podem provocar precipitados de cor preta do substrato.

10. Controle de qualidade - indicações da expiração do reagente

Para fins de controle de qualidade, controles positivos e negativos devem ser usados cada vez que o teste é realizado, para garantir que os reagentes estejam estáveis e que o teste seja realizado corretamente. O teste foi realizado corretamente se a taxa de extinção (O. D.) do controle negativo é inferior a 0,2 a 450 nm (inferior a 0,160 a 450/620 nm) e o valor medido para o controle positivo é maior que 0,8 a 450 nm ou a 450/620 nm. Um valor superior a 0,2 (0,160) para o controle negativo pode indicar que a lavagem foi insuficiente. O desvio os

valores exigidos, bem como uma cor turva ou azul do substrato incolor antes que seja colocado nos poços pode indicar que os reagentes expiraram.

Se os valores estipulados não forem obtidos, verifique os pontos a seguir antes de repetir o teste:

- Data de expiração dos reagentes usados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo usado (por exemplo: calibragem)
- Procedimento de teste correto
- Inspeção visual dos componentes do kit à procura de contaminação ou vazamentos - a solução de substrato que se tornou azul não deve ser usada.

Se mesmo assim as condições não forem preenchidas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor local da R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Cálculo do corte

Para estabelecer o corte, 0,15 unidade de extinção é adicionada à extinção medida para o controle negativo.

$$\text{Corte} = \text{extinção para o controle negativo} + 0,15$$

11.2. Resultados do teste

A avaliação da amostra é **positiva** se a taxa de extinção é mais do que 10% superior ao valor de corte calculado.

A avaliação da amostra é **marginal** se a taxa de extinção varia entre 10% menor e 10% maior que o valor de corte. Se a repetição do exame com uma nova amostra de fezes fica novamente na zona cinza, a avaliação da amostra é negativa.

Amostras com extinções mais de 10% abaixo do corte calculado devem ser consideradas **negativas**.

12. Limitações do método

O teste RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin identifica a enterotoxina do *Clostridium perfringens* em amostras de fezes humanas. Não é possível associar o nível determinado de extinção à ocorrência ou gravidade dos sintomas clínicos. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em conjunto com o quadro clínico.

Um resultado **positivo** não descarta a presença de outros patógenos infecciosos.

Um resultado **negativo** não descarta a possibilidade de infecção por *Clostridium perfringens*. O resultado pode ser causado pela quebra proteolítica de enterotoxinas na amostra devido à

condições insatisfatórias de armazenagem. Se o histórico do paciente respalda a suspeita de infecção por *Clostridium perfringens*, deve-se repetir o exame com outra amostra de fezes.

Um resultado **marginal** pode ser causado pela distribuição não homogênea de toxinas na amostra de fezes. Nesse caso, o exame deve ser repetido com uma segunda suspensão da mesma amostra ou outra amostra de fezes deve ser solicitada.

13. Características de desempenho

13.1. Comparação dos métodos do limite de detecção

Para estabelecer o limite de detecção, uma solução de estoque da enterotoxina (10 µg/ml) foi titulada em cada solução de tampão de amostra relevante e, em seguida, aplicada ao teste RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin, bem como em um ELISA comercialmente disponível de um concorrente. As concentrações de toxina em ambos os resultados de ELISA são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Comparação de dois ELISAs para a identificação da 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®	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
outro ELISA	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

O RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin ELISA pode detectar 0,04 ng/ml de enterotoxina pura e é, dessa forma, 60 vezes mais sensível que o ELISA comercialmente disponível do concorrente.

13.2. Reatividade cruzada

Diversos micro-organismos patogênicos do trato intestinal foram examinados com o RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin ELISA e não mostraram reatividade cruzada. Esses testes foram realizados com suspensões bacterianas (10^6 a 10^9 cfu/ml), com culturas de parasitas (10^7 a 10^9 organismos/ml) e sobrenadantes de culturas de células infectadas com o vírus. Os resultados desse estudo são resumidos na Tabela 2.

Tabela 2: Reatividade cruzada com micro-organismos patogênicos do trato intestinal

Organismo	Resultado [OD 450 nm]
Adenovírus	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
Rotavírus	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. Precisão

A reprodutibilidade do teste RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin foi investigada com seis referências que representam toda a faixa de medição, de fraco ao altamente positivo. Para determinar a reprodutibilidade intraensaio, 40 réplicas dessas referências foram testadas. Os valores médios e os coeficientes de variação (VC) de três lotes de kits foram determinados. Para a reprodutibilidade intraensaio, foram testadas referências de dez dias úteis diferentes em duplicadas, com duas execuções por dia. As medidas foram determinadas em três lotes de kits por três técnicos. A reprodutibilidade entre os lotes foi determinada para todos os três lotes dos kits.

Referências Valor médio / VC	Intraensaio			Entre ensaios			Entre lotes
	Lote de kits 1	Lote de kits 2	Lote de kits 3	Lote de kits 1	Lote de kits 2	Lote de kits 3	Lote de kits 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 Substâncias interferentes

As substâncias da lista a seguir não apresentaram efeitos sobre os resultados do teste quando misturadas às amostras de fezes positivas e negativas para enterotoxina do *Clostridium perfringens* nas concentrações descritas: sulfato de bário (5% w/w [peso/ peso]), loperamida (medicamento antidiarreico 5% w/w), Pepto-Bismol (medicamento antidiarreico, 5% v/w [volume/ peso]), mucinas (5% w/w), ciclamato (adoçante artificial, 5% v/w), sangue humano (5% v/w), ácido esteárico e ácido palmítico (mistura 1:1, 40% w/w), metronidazol (0,5) (medicamento antibiótico 5% v/w), diclofenaco (0,00263% v/w).

Apêndice

Símbolos específicos do teste:

Plate	Placa de micropoços
Diluent 1	Tampão de diluição da amostra
Wash	Tampão de lavagem
Control +	Controle positivo
Control -	Controle negativo
Conjugate 1	Conjugado 1
Conjugate 2	Conjugado 2
Substrate	Substrato
Stop	Reagente de parada

Bibliografia

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