

RIDASCREEN[®] Clostridium perfringens Enterotoxin

Art. n°.: C 0601



R-Biopharm AG, Landwehrstr. D-64293 Darmstadt, Alemania
Telf.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Área de aplicación

Para el diagnóstico *in vitro*. El test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin es un enzimoimmunoensayo para la identificación cualitativa de Clostridium perfringens enterotoxina en muestras de heces.

2. Resumen y explicación del test

La **Clostridium perfringens** es como todos los clostridios una bacteria ampliamente diseminada, formadora de esporas, grampositiva y anaerobia, que podemos encontrar con regularidad en la flora del intestino grueso del hombre. Se diferencia de los demás clostridios por la ausencia de flagelación peritrica. Se diferencian tipos de 5 Clostridium perfringens (A - E). Mientras que para el hombre tienen importancia principalmente el tipo A, y bajo determinadas condiciones (dieta, falta de tripsina), el tipo C, que provoca la enteritis necrotizante, en los animales se pueden encontrar todos los tipos. La clasificación de este grupo está en relación con la capacidad de formación de las toxinas principales (toxinas alfa, beta, épsilon e iota), todas las cuales tienen efectos citotóxicos y necrotizantes. Junto a estas cuatro toxinas principales también producen las cepas de C. perfringens una serie de distintas toxinas, entre las cuales se halla la enterotoxina, un polipéptido grande de 35 kDa, con relevancia patogenética para el hombre. Desde hace mucho tiempo se conoce la intoxicación alimentaria provocada por esta enterotoxina de C. perfringens (CPE). A través de la ingestión de alimentos conservados inadecuadamente, en especial de comidas ya cocinadas, se introducen en el organismo humano grandes cantidades de C. perfringens. Estas producen posteriormente grandes cantidades de toxinas y así se contraen enfermedades entéricas con diarrea y espasmos estomacales. La sintomatología se desencadena entre las 8 – 24 horas después del consumo de los alimentos contaminados y disminuye después de otras 24 horas. Sin embargo los vómitos, fiebre y cefaleas son más bien efectos colaterales raros. Junto a la CPE que ocasiona las intoxicaciones alimentarias se ha presentado en los últimos años cada vez con mayor frecuencia la diarrea asociada a antibióticos (AAD) causada por C. perfringens en alrededor del 10 % de todos los casos, así como en 5 - 20 % de los casos de las diarreas de manifestación esporádica (SPOR), que no están provocadas por intoxicaciones alimentarias. En esta forma de enfermedad diarreica y de aquí hasta la colitis pseudomembranosa (PMC) el curso de la afección es mucho peor y es de mayor duración (10 - 30 días), produciéndose con frecuencia heces mucosanguinolentas. En la exploración histológica de las secciones inferiores del colon y en el recto se encuentran áreas edematosas originadas por las lesiones causadas por la CPE. Recientes investigaciones han demostrado que la enterotoxina puede estar codificada tanto cromosomal como también episomal, pero que no obstante contiene la misma secuencia de aminoácidos en cada caso.

Además se encontró que en los aislados encontrados en las intoxicaciones alimentarias siempre formaban CPE codificado cromosomal, mientras que los aislados de pacientes con AAD o SPOR formaban CPE codificado por plásmido CPE. El efecto claramente más fuerte del CPE en AAD y SPOR reside probablemente en el estado de salud de los portadores afectados, que ya tenían otra enfermedad o eran más viejos y con sistema inmune deprimido. Especialmente entre las personas más viejas residentes en asilos o en pacientes hospitalizados se encuentra una mayor susceptibilidad a la colonización bacteriana por un lado, y por otro además una gran cantidad de portadores persistentes de *Clostridium perfringens*. Con el test RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin se dispone, junto al test RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B, de otro importante sistema de detección para el esclarecimiento de las afecciones diarreicas asociadas a antibióticos y de las esporádicas. Se posibilita así un diagnóstico rápido y fiable, además de que resulta de gran ayuda para las decisiones de una terapia.

3. Fundamento del test

En el test RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin se emplean anticuerpos específicos en un procedimiento sándwich. La superficie de la cavidad de la microplaca de titulación está recubierta con anticuerpos específicos contra epitopos de la enterotoxina de *C. perfringens*. Una suspensión de la muestra de heces que se ha de analizar se pipetea junto con otro anticuerpo monoclonal anti-*Clostridium perfringens* enterotoxina, el cual está conjugado con la peroxidasa del rábano picante, y se incuba en la cavidad de la microplaca. Si hay *Clostridium perfringens* enterotoxina (CPE) presente se forma un complejo sándwich entre el anticuerpo inmovilizado, el CPE y el anticuerpo conjugado. Los anticuerpos no enlazados que están marcados con una enzima se eliminan en un paso posterior de lavado. Después de añadir el sustrato, si la muestra es positiva, la enzima enlazada transforma el color de la solución en las cavidades de la microplaca de incolora hacia el azul. Mediante la adición de reactivo de parada se lleva a cabo un cambio de color del azul al amarillo. La absorbancia es proporcional a la concentración de CPE presente en la muestra.

4. Contenido del envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 96 determinaciones

Plate	96 determ.	Microplaca de titulación; 12 tiras de microtitulación (separables) en marco de soporte; recubiertas con anticuerpos específicos contra epitopos de <i>C. perfringens</i> Enterotoxina, contiene Kathon al 0,1 %
Diluent 3	100 ml	Buffer de dilución de muestras, solución de NaCl tamponada con buffer de proteína; contiene NaN_3 al 0,1 %; listo para el uso; teñido de rojo
Wash	100 ml	Buffer de lavado, solución de NaCl tamponada con buffer de fosfato (conc.10 veces); contiene Timerosal al 0,1 %
Control +	1,8 ml	<i>C. perfringens</i> Enterotoxina inactivada; contiene ProClin300 al 0,05 %; listo para el uso; teñido de rojo
Conjugate	10 ml	Anticuerpos monoclonales conjugados con peroxidasa en solución de proteína estabilizada; contiene Kathon al 0,1 %; listo para el uso, teñido de azul
Substrate	10 ml	Peróxido de urea/TMB; listo para el uso
Stop	6 ml	Reactivo de parada; solución 1 N de ácido sulfúrico; listo para el uso

5. Reactivos y su almacenamiento

Todos los reactivos se deben guardar entre 2 – 8 °C y pueden usarse hasta la fecha de vencimiento impresa en las etiquetas. El buffer de lavado diluido se puede conservar 4 semanas si se mantiene entre 2 – 8 °C. La contaminación microbiana se debe evitar. Después de la fecha de vencimiento no se asumen garantías de calidad. La bolsa de aluminio se debe cortar con una tijera de manera que el cierre no sea eliminado. Las tiras de microtitulación no usadas se deben guardar de inmediato en la bolsa de aluminio cerrada y a temperaturas entre 2 – 8 °C. Se debe evitar la incidencia directa de la luz sobre el sustrato incoloro para prevenir la descomposición o su coloración de azul debido a la autoxidación. Si ocurre una coloración azul no se deberá utilizar el sustrato.

6. Reactivos adicionales necesarios – accesorios requeridos

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- Tubos de muestra
- Pipetas desechables (Art. n°.: Z 0001)
- Vibrador Vortex (opcional, véase 9.3.)
- Micropipetas de 50 – 100 µl y de 1 ml de volumen
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Instrumento de lavado para las microplacas de titulación o pipetas multicanal (300 µl)
- Fotómetro lector de microplacas de titulación (450 nm, eventualmente filtro de referencia \geq 600 nm)
- Papel de filtro (pañeros de laboratorio)
- Recipiente de desechos con una solución de hipoclorito al 0,5 %

7. Medidas de seguridad

Sólo para el diagnóstico *in vitro*.

Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos. Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente.

El control positivo que se encuentra en el kit contiene *C. perfringens* Enterotoxin inactivada. No obstante debe ser manejado, al igual que las muestras de los pacientes, como potencialmente infeccioso de acuerdo a las reglamentaciones nacionales de seguridad.

No se debe pipetear las muestras o reactivos con la boca, así como también evitar el contacto con piel lesionada o mucosas. Durante el trabajo con las muestras deben usarse guantes desechables y lavar las manos después del test. En los locales donde se trabaje con las muestras o reactivos de prueba no está permitido fumar, comer o beber.

El buffer de dilución de muestras contiene NaN_3 al 0,1 %, el conjugado Kathon al 0,1 % como agente conservante. Se debe evitar por tanto el contacto con la piel o mucosas.

El buffer de lavado contiene Timerosal al 0,1 % como agente conservante. Se debe evitar por tanto el contacto con la piel o mucosas.

El peróxido de urea puede conducir a efectos cáusticos sobre la piel. ¡Manéjese con cuidado!

El reactivo de parada contiene una solución 1 N de ácido sulfúrico ¡Evítese el contacto con la piel o ropa! Si se produce contacto con la piel debe enjuagarse con agua.

Todos los materiales y reactivos que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas se requiere que sean tratados con agentes desinfectantes adecuados o se sometan a autoclave por lo menos una hora a 121 °C. ATENCIÓN: Para evitar la formación de gases venenosos deben neutralizarse los residuos líquidos que contengan reactivo de parada antes de echarlos en la solución de hipoclorito.

8. Recolección y conservación de las muestras

El material de examen se debe guardar entre 2 – 8 °C hasta el momento de su elaboración. Si el material no puede ser usado en el espacio de 3 días, se recomienda almacenarlo a –20 °C o menor temperatura. Evite congelar y descongelar las muestras varias veces. Las muestras de heces o frotis rectales no se deben recolectar en recipientes que contengan medios de transporte, agentes conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes debido a posibles interferencias con el test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin. Si se van a utilizar frotis rectales se debe prestar atención a que haya suficiente material de heces (aprox. 100 mg) para la realización del test. En los estudios de entorno se deben incluir también muestras de heces de personas de contacto clínicamente inaparentes para identificar portadores asintomáticos.

9. Realización del test

9.1. Generalidades

Antes de su utilización se deben adaptar todos los reactivos y la microplaca de titulación Plate a la temperatura ambiente (20 – 25 °C). Las tiras de microtitulación no se deben sacar de la bolsa de aluminio hasta que no hayan alcanzado la temperatura del ambiente. Los reactivos se deben mezclar bien inmediatamente antes de su empleo. Posterior a su uso se deben conservar las tiras de microtitulación (cerradas en su bolsa) y los reactivos otra vez a temperaturas entre 2 – 8 °C. Las tiras de microtitulación que se hayan usado una vez no pueden volverse a utilizar. Los reactivos y las tiras de microtitulación no se deben usar cuando el envase esté dañado o los recipientes hayan perdido su hermeticidad. Se debe evitar el contacto directo de las muestras con los componentes del kit para prevenir la contaminación cruzada.

Se debe evitar la incidencia directa de la luz solar durante la realización del test. Se recomienda tapar o pegar la microplaca de titulación para evitar pérdidas por evaporación.

9.2. Preparación del buffer de lavado

Se mezcla 1 parte del buffer de lavado concentrado **Wash** con 9 partes de agua destilada. Los cristales que pudieran encontrarse en el buffer concentrado se deben solubilizar primeramente con calor (baño María a 37 °C).

9.3. Preparación de las muestras

En un tubo de ensayo rotulado se vierte 1 ml de buffer de dilución de muestras de RIDASCREEN® **Diluent | 3**. Las heces líquidas se aspiran (aprox. 100 µl) con una pipeta desechable (Art. n° Z 0001) hasta ligeramente por encima del segundo espesamiento y se suspenden en el buffer preparado. En el caso de heces sólidas se toma una cantidad equivalente (alrededor de 50 – 100 mg) con una espátula o con un asa de siembra desechable y se suspende igualmente. La homogeneización de la suspensión de heces se efectúa mediante aspiración y expulsión con la pipeta desechable o alternativamente por agitación en un vibrador Vortex. Después de dejar reposar un corto tiempo, para lograr la sedimentación de partículas grandes de heces, se emplea directamente el sobrenadante claro obtenido de esta manera. En caso de usar para la determinación analítica un equipo ELISA automático el sobrenadante **tiene que** estar libre de partículas. Para estas determinaciones se recomienda entonces una centrifugación a 5000 rpm (aprox. 2000 - 2500 G) durante 5 minutos.

9.4. Primera incubación

Después de introducir una cantidad suficiente de cavidades en el marco de soporte se pipetea en cada una 2 gotas (100 µl) del control positivo **Control | +**, del buffer de dilución de muestras **Diluent | 3** (= control negativo) o de la muestra de heces en suspensión. A continuación se adicionan 2 gotas (100 µl) del anticuerpo conjugado con enzima **Conjugate**, se mezcla bien y se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.5. Lavado

Un lavado cuidadoso es importante para lograr resultados correctos por lo cual éste debe llevarse a cabo estrictamente según las instrucciones. Las muestras incubadas en las cavidades se deben vaciar primeramente en un recipiente de desechos con hipoclorito para la desinfección. Posteriormente se sacude la placa sobre un papel absorbente para eliminar los restos de humedad. Seguidamente se lava 5 veces con 300 µl de buffer de lavado en cada caso. Después de cada enjuague se debe prestar atención a vaciar completamente la placa sacudiéndola sobre partes secas y no usadas del papel.

Cuando se usen lavadores automáticos se debe velar por el ajuste correcto del instrumento al tipo de microplaca utilizado. Además es preciso que si se tiene una suspensión de heces no totalmente libre de partículas, que éstas sean eliminadas manualmente de las cavidades antes del primer lavado para evitar obstrucciones en las agujas de lavado. Igualmente se debe velar en los diferentes pasos de lavado por una aspiración completa del líquido. Después del último paso de lavado se debe sacudir la placa cuidadosamente sobre papel absorbente limpio o paños de laboratorio para eliminar la humedad residual. Para obtener resultados óptimos en el proceso de lavado se recomienda utilizar el modo de rebose con al menos 600 µl de buffer de lavado por cavidad y paso de enjuague. Es posible aumentar a más de 5 los pasos de enjuague y en casos particulares esto conduce a mejores resultados de lavado.

9.6. Segunda incubación

Añadir 2 gotas de sustrato (100 µl) **Substrate** a cada uno de los pocillos. A continuación se incuba la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente (20 -25 °C) en la oscuridad. Después se adiciona 1 gota (50 µl) de reactivo de parada **Stop** en cada una de las cavidades para detener la reacción. Se mezcla cuidadosamente (con ligeros golpes en los bordes de la placa) y se mide la absorbancia a 450 nm (opcional: Longitud de onda de referencia \geq 600 nm) La compensación del valor cero se debe realizar contra aire, o sea sin la microplaca.

Aviso : Muestras de pacientes con altos positivos pueden dar lugar a precipitados negruzcos del sustrato.

10. Control de calidad – Indicios de reactivos vencidos

Como control de calidad en cada determinación se debe añadir un control positivo y otro negativo para asegurar la estabilidad de los reactivos y un correcto desarrollo del test. El test ha transcurrido correctamente si el valor de absorbancia (O.D.) del control negativo a 450 nm es menor que 0,2 y el valor medido para el control positivo a 450 nm es mayor de 0,8. Si el valor del control negativo es mayor de 0,2 esto puede ser un indicio de que no se ha enjuagado suficientemente. Una desviación de los valores requeridos, lo mismo que una turbidez o coloración azul del sustrato incoloro antes de ser transferidos a las cavidades, puede ser un indicio de vencimiento de los reactivos. Si los valores predefinidos no se cumplen, se deben verificar los siguientes puntos antes de repetir el análisis:

- Durabilidad de los reactivos empleados
- Funcionamiento correcto de los instrumentos utilizados (por ej. la calibración)
- Ejecución correcta del test
- Control visual de los componentes del kit con respecto a contaminación o pérdida de hermeticidad; una solución de sustrato azulada no se debe volver a usar.

Si al repetir la determinación se obtienen nuevamente valores incorrectos Ud. debe dirigirse al fabricante o a su distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cálculo del valor límite

Para establecer el valor límite se le suma 0,15 al valor de absorbancia obtenido para el control negativo.

$$\text{cut-off (Valor límite)} = \text{Valor de absorbancia del control negativo} + 0,15$$

11.2. Resultado del test

Se evalúan como **positivas** las muestras cuyo valor de absorbancia se encuentra más de 10 % por encima del valor límite calculado.

Se denominan como muestras de **valores límites** y que deben repetirse, aquellas cuyo valor de absorbancia está en el rango de 10 % por encima o por debajo del valor límite. Si una repetición del análisis con una muestra de heces fresca posee de nuevo valores que corresponden al rango gris, entonces se debe evaluar la muestra como negativa.

Las muestras cuyos valores se encuentren en más de 10 % por debajo del valor límite calculado se evalúan como **negativas**.

12. Limitaciones del método

El test RIDASCREEN® Clostridium perfringens Enterotoxin identifica la enterotoxina de Clostridium perfringens en muestras de heces. No es posible a partir de este test deducir una relación entre la magnitud de un valor de absorbancia obtenido y la manifestación o gravedad de síntomas clínicos. **Los resultados obtenidos siempre deben interpretarse de conjunto con el cuadro clínico.**

Un resultado **positivo** no excluye la presencia de otros agentes infecciosos.

Un resultado **negativo** no excluye una posible infección con *Clostridium perfringens*. La causa de ello puede ser una excreción intermitente de enterotoxina o una cantidad demasiado baja de toxina en la muestra. Si existe la sospecha anamnésica fundada de una infección con *Clostridium perfringens* se debe repetir el análisis con otra muestra de heces.

Un resultado con **valores límites** puede ser ocasionado por una distribución no homogénea de la bacteria en la muestra de heces. Por este motivo se debe examinar en tales casos una segunda suspensión de la misma muestra o solicitar otra muestra de heces para repetir el análisis.

13. Características de rendimiento

13.1. Reactividad cruzada

Diferentes gérmenes patógenos del tracto intestinal fueron analizados con el test RIDASCREEN® *Clostridium perfringens* Enterotoxin y no presentaron reactividad cruzada. Los exámenes fueron realizados en suspensiones de bacterias con una concentración de 10^5 hasta 10^8 microorganismos por ml. Los resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Reacciones cruzadas con microorganismos patógenos

Germen de prueba	Origen	Resultado	Suspensión
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DSM 2403	negativo	0,002
<i>Aeromonas hydrophilia anaerogenes</i>	DSM 30022	negativo	0,002
<i>Aeromonas hydrophilia hydrophilia</i>	DSM 30016	negativo	0,004
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30047	negativo	0,004
<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30039	negativo	0,004
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	negativ	0,008
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	negativo	0,005
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477	negativo	0,010
<i>Escherichia coli</i>	aislamiento	negativo	0,002
<i>Escherichia coli</i>	aislamiento	negativo	0,005
<i>Escherichia coli</i>	aislamiento	negativo	0,004
<i>Escherichia hermannii</i>	DSM 4560	negativo	0,003
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 20481	negativo	0,008
<i>Listeria innocua</i>	SLCC 5639	negativo	0,006
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 788	negativo	0,003
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479	negativo	0,005
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM 30119	negativo	0,000

Providencia stuartii	DSM 6676	negativo	0,001
Pseudomonas arruginosa	DSM 939	negativo	0,018
Pseudomonas fluorescens	DSM 4358	negativo	0,007
Pseudomonas fluorescens	DSM 50124	negativo	0,003
Pseudomonas putida	DSM 291	negativo	0,007
Salmonella Agona	aislamiento	negativo	0,003
Salmonella Cholerasuis	DSM 4224	negativo	0,005
Salmonella Infantis	aislamiento	negativo	0,005
Salmonella Ohio	aislamiento	negativo	0,006
Salmonella Typhimurium	aislamiento	negativo	0,004
Germen de prueba	Origen	Resultado	Suspensión
Serratia proteamaculans	DSM 4487	negativo	0,003
Shigella flexneri	DSM 4782	negativo	0,003
Shigella sonnei	DSM 5570	negativo	0,004
Staphylococcus aureus	DSM 20372	negativo	0,014
Streptococcus agalactiae	aislamiento	negativo	0,001
Streptococcus dysgalactiae	aislamiento	negativo	0,000
Streptococcus uberis	aislamiento	negativo	0,005
Escherichia coli (O157:H-)	aislamiento	negativo	0,001
Escherichia coli (O116:H21)	aislamiento	negativo	0,000
Escherichia coli (O111:H-)	aislamiento	negativo	0,001
Escherichia coli (O26:H8)	aislamiento	negativo	0,002
Control negativo (TSB)			0,004
Control positivo (Kit de prueba)			2,018
Cut-off (Valor límite)			0,150
	Origen	Resultado	Suspensión
Candida albicans	ATCC 10231	negativo	0,000
Campylobacter coli	DSM 4689	negativo	-0,001
Campylobacter fetus	DSM 5361	negativo	0,000
Campylobacter jejuni	DSM 4688	negativo	0,001
Morganella morganii	DSM 6675	negativo	0,003
Samonella Enteritis	DSM 9898	negativo	0,001
Control positivo			2,091
Control negativo			0,001
Cut-off (Valor límite)			0,151

13.2. Precisión

La reproducibilidad intra-ensayos se determinó en muestras de heces con *C. perfringens* enterotoxina en 3 diferentes concentraciones en un grupo de 24 análisis con los reactivos de un kit. Se determinaron el valor promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Reproducibilidad intra-ensayos

Intra-Ensayos (n=24)			
Muestra	Absorbancia promedio	Desv. estándar	Coeficiente de Variabilidad %
A	2,494	0,0302	1,21
B	1,253	0,0471	3,76
C	0,549	0,0337	6,13
NEGKO	0,051	0,0046	8,96
Promedio			5,1

La reproducibilidad inter-ensayos se determinó en muestras de heces con *C. perfringens* enterotoxina en 3 diferentes concentraciones en 5 grupos diferentes de análisis con los reactivos de un kit. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Reproducibilidad inter-ensayos

Inter-Ensayos (n=5)			
Muestra	Absorbancia promedio	Desv. estándar	Coeficiente de Variabilidad %
A	2,481	0,0464	1,87
B	1,213	0,0757	6,24
C	0,58	0,0198	3,41
NEGKO	0,054	0,0051	9,37
Promedio			5,22

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. *Infektion 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. *Infektion 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)