

Diagnóstico e investigación epidemiológica de un brote de toxiinfección alimentaria causado por *Clostridium perfringens*

Juan Carlos Sanz^a, María Felicitas Domínguez^b, María Jesús Sagües^a, Marisa Fernández^a, Ricardo Feito^b, Rosa Noguerales^b, Ángel Asensio^a y Karoline Fernández de la Hoz^b

^aLaboratorio Regional de Salud Pública y ^bServicio de Salud Pública Área Sanitaria II. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad Comunidad de Madrid. España.

FUNDAMENTO. Aunque *Clostridium perfringens* es un agente clásico de toxiinfección alimentaria, la levedad y el carácter autolimitado del cuadro limita con frecuencia su confirmación microbiológica. Este estudio describe la investigación de un brote de diarrea por *C. perfringens* ocurrido en un establecimiento público de hostelería.

MÉTODOS. Se realizó una encuesta epidemiológica y una inspección del establecimiento. Para los distintos alimentos consumidos se calcularon las tasas específicas de ataque. La causalidad independiente de cada plato se estableció calculando las odds ratio ajustadas mediante un modelo de regresión logística. La investigación de la toxina de *Clostridium perfringens* en heces de 4 enfermos y de un sujeto expuesto asintomático se realizó por aglutinación pasiva reversa por látex.

RESULTADOS. La tasa global de ataque fue del 70,8%. La sintomatología consistió fundamentalmente en diarrea (100%) y dolor abdominal (94%). Se detectaron diferencias significativas en las tasas específicas de ataque para el consumo de diferentes platos. Sin embargo, la contribución independiente de cada uno de ellos sólo resultó significativa para el consumo de "ravioli con salsa de queso". La detección fecal de enterotoxina de *C. perfringens* resultó positiva en los 4 enfermos estudiados, pero no en el sujeto expuesto y asintomático.

CONCLUSIONES. En este brote la tasa global de ataque fue alta. La sintomatología concuerda con los datos previamente publicados. El análisis epidemiológico implicó a los "ravioli con salsa de queso" como alimento responsable y la investigación clínica, junto con la detección de la toxina en heces, permitieron identificar a *C. perfringens* como el agente etiológico.

Palabras clave: *Clostridium perfringens*. Brote. Enterotoxina. Heces.

Diagnosis and epidemiological investigation of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning

OBJECTIVE. *Clostridium perfringens* is a classical agent of food-borne disease but because of the mildness and self-limiting nature of the illness, many cases are undiagnosed. This study describes the investigation of an outbreak of diarrhea due to *C. perfringens* in a public restaurant.

METHODS. An epidemiological survey was performed and the restaurant was inspected. The specific attack rates for the items on the menu were calculated. Odds ratios were calculated to investigate the independent association between each item and the disease using a logistic regression model. Investigation of *C. perfringens* toxin in the feces of four symptomatic subjects and one exposed but asymptomatic subject was performed by the reverse passive latex agglutination test.

RESULTS. The overall attack rate was 70.8%. The main symptoms were diarrhea (100%) and abdominal pain (94%). Significant differences were found in specific attack rates for consumption of different menu items. However, the independent contribution of each item was significant only for consumption of "ravioli with cheese sauce". Fecal detection of *C. perfringens* enterotoxin was positive in the four symptomatic subjects and negative in the exposed but asymptomatic subject.

CONCLUSIONS. The overall attack rate in this outbreak was high. The clinical symptomatology was similar to previously published data. The epidemiological analysis revealed "ravioli with cheese sauce" to be responsible for transmission of the disease and clinical investigation together with the fecal enterotoxin detection established *C. perfringens* as the etiological agent.

Key words: *Clostridium perfringens*. Outbreak. Enterotoxin. Feces.

Introducción

Las bacterias capaces de producir gastroenteritis pueden clasificarse de una manera esquemática en

Correspondencia: Dr. J.C. Sanz.
Laboratorio Regional de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública.
Consejería de Sanidad Comunidad de Madrid.
General Oraa, 15. 28006 Madrid.
Correo electrónico: jcsanz1@teleline.es

Manuscrito recibido el 31-07-2001; aceptado el 27-09-2001.

3 categorías: las que dan lugar a una infección cuando son ingeridas y se multiplican en el tubo digestivo, las que originan la enfermedad a través de la liberación intraintestinal de toxinas, y aquellas que lo hacen mediante la producción de enterotoxinas en los alimentos antes de su consumo¹. En este tercer grupo se encuadra *Clostridium perfringens* que, desde este punto de vista, podría considerarse más bien una causa de intoxicación que de infección. Este microorganismo es un bacilo grampositivo esporulado que forma parte de la flora anaeróbica normal del ser humano. Las cepas de esta especie se distribuyen en 5 tipos (A-E)². La mayor parte de los casos de toxiinfección alimentaria está producido por cepas del tipo A¹. El vehículo de transmisión suele consistir en productos cárnicos poco cocinados. Las esporas de esta bacteria resisten las condiciones de temperatura asociadas con la preparación de los alimentos y pueden germinar durante la fase de enfriamiento de los platos, dando lugar a organismos que se multiplican y producen cantidades suficientes de enterotoxina³. Las manifestaciones clínicas (diarrea y dolor abdominal) suelen aparecer unas horas después de la ingesta del alimento y el cuadro acostumbra a resolverse en un período de pocos días³. Dada su naturaleza, estos procesos no precisan tratamiento antibiótico, debiendo aplicarse tan sólo medidas de soporte o mantenimiento².

Si bien *C. perfringens* es un agente clásico de toxiinfección alimentaria y constituye un ejemplo de diarrea por ingesta de una enterotoxina preformada, una revisión bibliográfica detallada permite comprobar la escasez de informes sobre este tipo de brotes. La presentación leve y autolimitada de estos cuadros y la relativa dificultad de su confirmación microbiológica hacen que esta bacteria quede excluida en la mayoría de las ocasiones del diagnóstico rutinario de laboratorio. No obstante, un análisis de las características epidemiológicas de estos brotes, junto con la disponibilidad actual de técnicas rápidas de laboratorio que permiten detectar la toxina en heces, puede conducir al diagnóstico de la mayor parte de estos procesos⁴. En países como Francia se estima que ciertas bacterias productoras de enterotoxinas, como *Staphylococcus aureus* o *C. perfringens*, pueden ser responsables del 30% del total de los brotes de gastroenteritis⁵. Durante el período 1992-1994, *C. perfringens* supuso en Inglaterra y Gales el 8% de los brotes diarreicos notificados en instituciones cerradas⁶, el 4% de los brotes asociados con catering doméstico⁷ y el 7% de los brotes registrados en la población general⁸.

El objetivo de este estudio es describir la investigación clínicoepidemiológica y microbiológica de un brote de diarrea por *C. perfringens* que afectó a las componentes de un equipo de baloncesto femenino tras una comida en un establecimiento público.

Material y método

El día 1 de junio de 2001 se notificó un brote de toxiinfección alimentaria entre las integrantes de un equipo de baloncesto femenino que el día anterior (31 de mayo) habían acudido a comer a un establecimiento de hostelería pública. Este grupo, compuesto por 24 personas (12 jugadoras de 12 a 14 años, 3 entrenadores y 9 acompañantes), había consumido una comida que consistió en ravioli con salsa de queso, jamón al horno con verduras y helados industriales

de diferentes sabores. Los primeros casos aparecieron por la tarde del mismo día 31. Al día siguiente se realizaron las encuestas epidemiológicas mediante una entrevista personal a todas las componentes del equipo de baloncesto y acompañantes. Se recogió información sobre la edad, la presencia de síntomas de gastroenteritis en las 24 horas siguientes a la comida sospechosa, evolución del cuadro, asistencia médica recibida y alimentos consumidos durante el día 31 de mayo de 2001. Se consideró la siguiente definición clínica de caso: persona que almorzó el día 31 de mayo de 2001 en el citado establecimiento y que en las 24 horas posteriores presentó algún síntoma gastrointestinal. Se realizó una descripción de las principales características clínicoepidemiológicas de los casos: edad, sexo, período de incubación y distribución temporal, determinando los porcentajes de aparición de síntomas y la tasa de ataque global con sus intervalos de confianza del 95% (IC del 95%). Asimismo, se calcularon las diferencias de tasas específicas de ataque entre expuestos y no expuestos a los distintos alimentos consumidos. Para analizar el nivel de significación se utilizó el test exacto de Fisher de comparación de proporciones, considerando estadísticamente significativas las diferencias con $p \leq 0,05$. La posible asociación entre el consumo de cada alimento y la enfermedad se estableció calculando las odds ratio (OR) crudas y ajustadas por el resto de alimentos (con sus IC del 95%) mediante modelos de regresión logística.

El día de la notificación se cursó una visita de inspección al establecimiento (cocina e instalaciones anexas), comprobando tanto las condiciones estructurales e higienicosanitarias como las prácticas de manipulación de los empleados del mismo. Debido a la ausencia de restos de comida, no fue posible recoger muestras de los alimentos del menú sospechoso.

Se obtuvieron muestras de heces de 4 enfermos y de un sujeto expuesto pero asintomático en un plazo inferior a 2 días desde la exposición (y en el caso de los enfermos inferior a un día desde el inicio del cuadro). Se realizaron coprocultivos siguiendo una metodología estándar y descartando la presencia de enteropatógenos habituales como *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Yersinia* sp. o *Campylobacter* sp. Asimismo, se excluyó una etiología vírica por agentes como rotavirus o adenovirus mediante una técnica de aglutinación por látex (Diarlex Rota-Adeno, Orion Diagnostica). La investigación de la toxina de *C. perfringens* en heces se realizó mediante un procedimiento de aglutinación pasiva reversa por látex (Pet-Rpla, OXoid). Para ello, las muestras fueron homogeneizadas en PBS y centrifugadas a 1.300 rpm durante 20 min a 4 °C. Posteriormente se procedió a filtrar el sobrenadante en una membrana de 0,22 micras de poro y se enfrentó a diluciones seriadas con una suspensión de partículas de látex ligadas a un anticuerpo específico frente a la toxina tipo A.

Resultados

Se encuestó al 100% de las personas del equipo de baloncesto y acompañantes ($n = 24$), de las que 17 cumplieron la definición clínica de caso, con una tasa de ataque global del 70,8% (IC del 95% 48,7-86,6). El 70,6% de los casos fueron mujeres y el rango de edad fue 11 a 40 años (media, 18,7 años). El período de incubación fue de 3 a 20 h (mediana, 11 h) (fig. 1). La sintomatología consistió fundamentalmente en diarrea y dolor abdominal, acompañados o no de náuseas, vómitos, malestar general y cefalea (fig. 2). La duración de los síntomas fue de 18 a 24 h. Todos los casos evolucionaron favorablemente sin necesidad de hospitalización.

El estudio estadístico para determinar la posible fuente de infección demostró diferencias significativas en las tasas de ataque entre expuestos y no expuestos, tanto para el consumo de ravioli con salsa de queso ($p = 0,009$) como para el de jamón asado ($p = 0,038$) (tabla 1). Dado que el 62,5% de los sujetos estudiados habían comido ambos platos, se realizó un análisis de regresión logística

Figura 1. Distribución de los casos según la hora de inicio de los síntomas.



Figura 2. Frecuencia de los síntomas en los casos (n = 17).

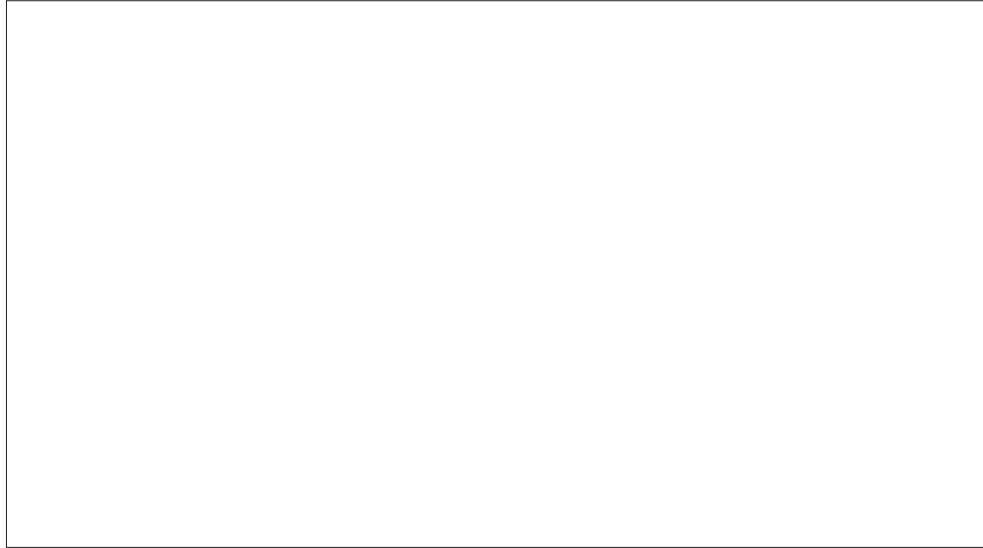


TABLA 1. Número de enfermos y tasas de ataque en función del alimento consumido

Alimento	Expuestos				No expuestos				Diferencias de tasas	p
	Enfermos n	No enfermos n	Total n	Tasa de ataque %	Enfermos n	No enfermos n	Total n	Tasa de ataque %		
Ravioli con queso	15	2	17	88,2	2	5	7	28,6	59,6	0,009
Jamón con verduras	15	3	18	83,3	2	4	6	33,3	50,0	0,038
Helado	12	2	14	85,7	5	5	10	50,0	35,7	> 0,05

para estimar la contribución independiente de cada uno de ellos a la enfermedad. Tras este análisis, el nivel de significación estadística se conservó únicamente en el caso de los ravioli con salsa de queso (OR para ravioli con salsa de queso = 11,8; IC del 95% 1,1-121,7; OR para jamón asado = 4,5; IC del 95% 0,4-53,7) (tabla 2). Este plato se había elaborado durante la mañana del día 31, a partir de pasta industrial rellena de carne, y se acompañó de

TABLA 2. Estimación de riesgo de enfermar según el alimento. Odds ratio (OR) crudos y ajustados mediante regresión logística

Alimento	OR cruda	IC del 95%	OR ajustada	IC del 95%
Ravioli con salsa de queso	18,7	2,06-170,2	11,8	1,1-121,7
Jamón con verduras	10,0	1,22-81,7	4,5	0,4-53,7

salsa de queso rallado con leche UHT. Ambos ingredientes (pasta y salsa) fueron preparados por separado y mantenidos en baño maría hasta el momento de ser servidos.

El establecimiento presentó en el momento de la inspección diversas deficiencias higienicosanitarias y anomalías en la manipulación de los alimentos, como la presencia de alimentos expuestos a temperatura ambiente y el almacenamiento en cámaras frigoríficas de alimentos en diferentes fases de elaboración sin protección para prevenir contaminaciones cruzadas (contaminación de un producto crudo a un producto terminado) o con protección inadecuada (paños de tela).

La investigación realizada en heces demostró la presencia de la toxina de *C. perfringens* en los 4 enfermos estudiados, pero no en el sujeto expuesto y asintomático (títulos de aglutinación específica en los enfermos $\geq 1/32$ con aglutinaciones inespecíficas $\leq 1/2$). En todos los casos, el estudio de otros enteropatógenos aportó resultados negativos.

Discusión

Aunque las toxiinfecciones alimentarias causadas por *C. perfringens* pueden aparecer de forma esporádica y difundirse persona a persona⁹, generalmente ocurren en forma de brotes registrados en residencias de ancianos¹⁰, hospitales¹¹⁻¹⁴, clínicas^{15,16}, reformatorios^{17,18}, cárceles¹⁹, campos juveniles²⁰, colegios²¹, restaurantes²¹ y otros comedores colectivos²². El diagnóstico etiológico de estos brotes generalmente se realiza sólo de manera ocasional y en especial en aquellas situaciones en las que resulta afectado un importante número de personas. Sin embargo, estos procesos quizás constituyan una causa muy frecuente de enfermedad gastrointestinal no filiada microbiológicamente. La confirmación de laboratorio se lleva a cabo por diferentes procedimientos, como cultivo, amplificación del gen de la enterotoxina por PCR¹⁰ o detección de la toxina en heces mediante contrainmunoelectroforesis^{23,24}, ELISA²⁴⁻²⁷ y aglutinación pasiva reversa por látex^{9,16,28-31}. En el pasado se empleó con frecuencia el recuento de la bacteria en heces^{32,33}. Tradicionalmente se consideró que un valor superior a 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces constituía un elemento diagnóstico³³⁻³⁵. Sin embargo, el hecho de que en personas sanas sea frecuente la aparición de valores elevados de esporas limita el uso del recuento para el diagnóstico de estos brotes^{16,34}. El diagnóstico basado meramente en el cultivo de la bacteria en heces puede enmascarar la verdadera etiología de cuadros causados por otros agentes^{36,37}. Además, no todas las cepas de *C. perfringens* son productoras de enterotoxina. Sólo un 6% de los aislamientos procedentes de animales sanos posee el gen que codifica esta toxina³⁴. La existencia en un mismo brote de cepas clonalmente relacionadas productoras y no productoras de enterotoxina sugiere que este gen es un elemento móvil que puede perderse²⁸.

La detección cuantitativa del microorganismo ($> 10^5$ UFC por gramo) en el alimento sospechoso también se ha postulado como un procedimiento útil^{10,33}. Lamentablemente, no siempre se encuentran disponibles restos de la comida implicada para su estudio

microbiológico³⁵. En caso de que se llegue a cultivar la bacteria en alimentos es preciso comprobar que se trata de la misma cepa que la aislada en las heces de los enfermos. Para ello se ha empleado la serotipificación^{9,33,35,38-40} y el análisis plasmídico^{38,39,41}. Sin embargo, los reactivos requeridos para la serotipificación no se encuentran ampliamente disponibles y muchos aislamientos no son tipificables por este procedimiento⁴². Por otra parte, el perfil plasmídico presenta la desventaja de que no todos los aislamientos poseen plásmidos y, además, aun en el caso de que existan, éstos pueden perderse⁴¹. Recientemente se han introducido otras técnicas, como la electroforesis en campos pulsantes^{9,28,42}, el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados⁴³ y la ribotipificación⁴⁴. No obstante, estas últimas técnicas de tipificación no se encuentran al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos. Por estos motivos, la identificación de la enterotoxina mediante aglutinación pasiva reversa por látex constituye una alternativa muy eficaz para confirmar la aparición de estos brotes. Este procedimiento es un método muy específico para el diagnóstico de la toxiinfección por *C. perfringens*¹⁶, se correlaciona bien con la detección mediante PCR del gen de la enterotoxina²⁸, es más sensible y reproducible que los análisis de citotoxicidad celular³¹ y resulta más simple que las técnicas de ELISA²⁹⁻³¹. En el presente trabajo, la investigación realizada en heces demostró la presencia de la toxina de *C. perfringens* en los 4 enfermos estudiados, pero no en el sujeto expuesto y asintomático. Estos resultados concuerdan con los observados por otros autores¹⁶. Aunque los sujetos expuestos pero asintomáticos pueden presentar recuentos de *C. perfringens* en heces similares a los detectados en los individuos realmente enfermos, sólo en estos últimos es posible detectar la enterotoxina en heces mediante aglutinación pasiva reversa por látex¹⁶. En la investigación de brotes por *C. perfringens* es importante el momento de obtención de las muestras de heces. En el estudio de este brote, todas las muestras fueron tomadas tempranamente (tiempo inferior a 2 días desde la exposición). La eliminación fecal de la toxina es de corta duración, siendo máxima entre el primer y segundo días y disminuyendo a partir este momento^{23,24}. Los límites de detección de la toxina mediante aglutinación pasiva reversa por látex se sitúan en 2-4 ng por gramo de muestra^{30,31} y son comparables a los aportados por otras técnicas inmunológicas como ELISA²⁴⁻²⁷. La concentración de la toxina en la mayoría de los enfermos afectados en un brote puede ser del orden de microgramos por gramo de heces^{24,25}. La enterotoxina de *C. perfringens* es inmunológicamente muy estable, lo que permite la conservación de las muestras durante períodos prolongados de tiempo hasta su estudio²⁷.

La tasa global de ataque detectada en este brote (70,8%) es muy alta, y a pesar de tratarse en la mayoría de los casos de personas jóvenes y sanas (deportistas), es superior a las observadas en otros estudios (42-61%)^{14,20,22,45}. El período de incubación y la presentación clínica de los casos aquí descritos concuerdan con los datos previamente publicados. Estos cuadros se caracterizan en general por la aparición de dolor abdominal, diarrea y náuseas^{20,35}. El período de incubación y la duración de la enfermedad son cortos^{21,35}. A pesar de

su levedad, en raras ocasiones se puede producir la muerte de los afectados, especialmente entre ancianos y enfermos^{12,14,21}. Aunque en humanos la enfermedad causada por *C. perfringens* suele ser benigna, este microorganismo origina en animales enfermedades graves, como enteritis necrosante⁴⁶ y enterotoxemia^{47,48}. Incluso se ha relacionado con el desarrollo de lesiones neoplásicas en ratones⁴⁹.

Los cuadros de toxiinfección por *C. perfringens* se han asociado generalmente con el consumo de productos ricos en proteínas de origen animal, como pollo^{20,33}, pavo^{16,21}, cerdo^{11,14,18} o ternera^{12,18,50}. Sin embargo, también se han identificado como fuente de infección otros alimentos, como ensaladas⁵¹ y legumbres^{10,52}. Los purés, salsas y otros alimentos líquidos pueden, asimismo, verse involucrados favoreciendo la aparición de contaminaciones cruzadas^{15,21,22}. En el presente estudio, el análisis epidemiológico implicó los ravioli con salsa de queso como el alimento responsable y la investigación clínica junto con la detección de la toxina en heces permitieron confirmar que *C. perfringens* fue el agente etiológico del brote. En el establecimiento se detectaron anomalías en la manipulación referentes al almacenamiento y mantenimiento de los alimentos. En muchos de los brotes causados por esta bacteria también se ha detectado este tipo de deficiencias⁵³, relacionadas especialmente con una inadecuada temperatura de conservación y con el recalentamiento insuficiente de los platos previamente preparados, que en ocasiones permiten la aparición de contaminaciones cruzadas^{14,20,22,52,53}. Para evitarlas se recomienda el enfriamiento rápido de los alimentos tras su elaboración, su conservación en porciones no demasiado grandes y el calentamiento apropiado^{11,14,22,51,52}. *C. perfringens* es un agente bastante resistente a la cloración de las aguas⁵⁴, sin embargo, su inactivación en alimentos precocinados se consigue mediante recalentamiento a 70 °C¹⁵.

El estudio epidemiológico de este tipo de brotes y su confirmación mediante pruebas de laboratorio puede clarificar el verdadero papel de *C. perfringens* como agente etiológico de los procesos gastrointestinales y ayudar a establecer las medidas necesarias para su control.

Bibliografía

1. López-Brea M, Sanz JC. Infección Gastrointestinal. Microbiología médica. En: García Rodríguez JA, Picazo JJ, editores. Microbiología clínica. Madrid: Mosby/Doyma Libros SA, 1996; p. 227-51.
2. López-Brea M, Sanz JC, Usera MA, Reina J, Cardeñoso L, Vasallo F. Gastroenteritis bacterianas, víricas, parasitarias, y toxiiinfecciones alimentarias. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 1994;7:1-30.
3. López-Brea M, Sanz JC. Enteritis (bacterianas, víricas, parasitarias y fúngicas) y toxiiinfecciones alimentarias. Tratado de medicina interna. Medicina, 1994;72:3183-92.
4. Arcieri R, Dionisi AM, Caprioli A, Lopalco P, Prato R, Germinario C, et al. Direct detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin in patients' stools during an outbreak of food poisoning. FEMS Immunol Med Microbiol 1999;23:45-8.
5. Tremolieres F. Food poisoning-infections in metropolitan France. Rev Prat 1996;46:158-65.
6. Ryan MJ, Wall PG, Adak GK, Evans HS, Cowden JM. Outbreaks of infectious intestinal disease in residential institutions in England and Wales 1992-1994. J Infect 1997;34:49-54.
7. Ryan MJ, Wall PG, Gilbert RJ, Griffin M, Rowe B. Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. Commun Dis Rep CDR Rev 1996;6:179-83.
8. Djuretic T, Wall PG, Ryan MJ, Evans HS, Adak GK, Cowden JM. General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales 1992 to 1994. Commun Dis Rep CDR Rev 1996;6:57-63.
9. Wada A, Masuda Y, Fukayama M, Hatakeyama T, Yanagawa Y, Watanabe H, et al. Nosocomial diarrhoea in the elderly due to enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. Microbiol Immunol 1996;40:767-71.
10. Miwa N, Masuda T, Terai K, Kawamura A, Otani K, Miyamoto H. Bacteriological investigation of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning caused by Japanese food without animal protein. Int J Food Microbiol 1999;1:49:103-6.
11. Regan CM, Syed Q, Tunstall PJ. A hospital outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning-implications for food hygiene review in hospitals. J Hosp Infect 1995;29:69-73.
12. Pollock AM, Whitty PM. Outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning. J Hosp Infect 1991;17:179-86.
13. Yamagishi T, Sakamoto K, Sakurai S, Konishi K, Daimon Y, Matsuda M, et al. A nosocomial outbreak of food poisoning caused by enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. Microbiol Immunol 1983;27:291-6.
14. Thomas M, Noah ND. Hospital outbreak of *Clostridium perfringens* food-poisoning. Lancet 1977;1:1046-8.
15. Tallis G, Ng S, Ferreira C, Tan A, Griffith J. A nursing home outbreak of *Clostridium perfringens* associated with pureed food. Aust N Z J Public Health 1999;23:421-3.
16. Birkhead G, Vogt RL, Heun EM, Snyder JT, McClane BA. Characterization of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning by quantitative fecal culture and fecal enterotoxin measurement. J Clin Microbiol 1988;26:471-4.
17. Parikh AI, Jay MT, Kassam D, Kociemba T, Dworkis B, Bradley PD, et al. *Clostridium perfringens* outbreak at a juvenile detention facility linked to a Thanksgiving holiday meal. W J Med 1997;166:417-9.
18. Tavris DR, Murphy RP, Jolley JW, Harmon SM, Williams C, Brumback CL. Two successive outbreaks of *Clostridium perfringens* at a state correctional institution. Am J Public Health 1985;75:287-8.
19. Cieslak PR, Curtis MB, Coulombier DM, Hathcock AL, Bean NH, Tauxe RV. Preventable disease in correctional facilities. Desmotic foodborne outbreaks in the United States, 1974-1991. Arch Intern Med 1996;156:1883-8.
20. Hook D, Jalaludin B, Fitzsimmons G. *Clostridium perfringens* food-borne outbreak: an epidemiological investigation. Aust N Z J Public Health 1996;20:119-22.
21. Caroli G, Armani G, Sciacca A, Bargagna M, Levre E. Two outbreaks of "*Clostridium perfringens*" food poisoning: epidemiological remarks. Ann Scavo 1977;19:494-501.
22. Petersen LR, Mshar R, Cooper GH Jr, Bruce AR, Hadler JL. A large *Clostridium perfringens* foodborne outbreak with an unusual attack ratepattern. Am J Epidemiol 1988;127:605-11.
23. Naik HS, Duncan CL. Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin in human fecal samples and anti-enterotoxin in sera. J Clin Microbiol 1978;7:337-40.
24. Bartholomew BA, Stringer MF, Watson GN, Gilbert RJ. Development and application of an enzyme linked immunosorbent assay for *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. J Clin Pathol 1985;38:222-8.
25. Wimsatt JC, Harmon SM, Shah DB. Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin in stool specimens and culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay. Diagn Microbiol Infect Dis 1986;4:307-13.
26. Jackson SG, Yip-Chuck DA, Brodsky MH. A double antibody sandwich enzyme-immunoassay for *Clostridium perfringens* type A enterotoxin detection in stool specimens. J Immunol Methods 1985;83:141-50.
27. Notermans S, Heuvelman C, Beckers H, Uemura T. Evaluation of the ELISA as tool in diagnosing *Clostridium perfringens* enterotoxins. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 1984;179:225-34.
28. Ridell J, Bjorkroth J, Eisgruber H, Schalch B, Stolle A, Korkeala H. Prevalence of the enterotoxin gene and clonality of *Clostridium perfringens* strains associated with food-poisoning outbreaks. J Food Prot 1998;61:240-3.
29. Berry PR, Stringer MF, Uemura T. Comparison of latex agglutination and ELISA for the detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in faeces. Letts Appl Microbiol 1986;2:101-2.
30. Harmon SM, Kautter DA. Evaluation of a reversed passive latex agglutination test kit for *Clostridium perfringens* enterotoxin. J Food Prot 1986;49:523-5.
31. Berry PR, Rodhouse JC, Hughes S, Bartholomew B, Gilber RJ. Evaluation of ELISA, RPLA and vero cell assays for detecting *Clostridium perfringens* enterotoxin in faecal specimens. J Clin Pathol 1988;41:458-61.

32. Harmon SM, Kautter DA. Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in human feces: comparison of four culture media. *J Assoc Off Anal Chem* 1987;70:994-6.
33. Schiemann DA. Laboratory confirmation of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning. *Health Lab Sci* 1977;14:35-8.
34. Labbe RG. Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. *Clostridium perfringens*. *J Assoc Off Anal Chem* 1991;74:711-4.
35. Gross TP, Kamara LB, Hatheway CL, Powers P, Libonati JP, Harmon SM, et al. *Clostridium perfringens* food poisoning: use of serotyping in an outbreak setting. *J Clin Microbiol* 1989;27:660-3.
36. Rennie RP, Anderson CM, Wensley BG, Albrtton WL, Mahony DE. *Klebsiella pneumoniae* gastroenteritis masked by *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol* 1990;28:216-9.
37. Sekla L, Stackiw W, Dzogun S, Sargeant D. Foodborne gastroenteritis due to Norwalk virus in a Winnipeg hotel. *Can Med Assoc J* 1989;140:1461-4.
38. Mahony DE, Ahmed R, Jackson SG. Multiple typing techniques applied to a *Clostridium perfringens* food poisoning outbreak. *J Appl Bacteriol* 1992;72:309-14.
39. Mahony DE, Stringer MF, Borriello SP, Mader JA. Plasmid analysis as a means of strain differentiation in *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol* 1987;25:1333-5.
40. Stringer MF, Turnbull PC, Gilbert RJ. Application of serological typing to the investigation of outbreaks of *Clostridium perfringens* food poisoning, 1970-1978. *J Hyg* 1980;84:443-56.
41. Eisgruber H, Wiedmann M, Stolle A. Use of plasmid profiling as a typing method for epidemiologically related *Clostridium perfringens* isolates from food poisoning cases and outbreaks. *Lett Appl Microbiol* 1995;20:290-4.
42. Maslanka SE, Kerr JG, Williams G, Barbaree JM, Carson LA, Miller JM, et al. Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations. *J Clin Microbiol* 1999;37:2209-14.
43. McLaughlin J, Ripabelli G, Brett MM, Threlfall EJ. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *Int J Food Microbiol* 2000;56:21-8.
44. Schalch B, Bjorkroth J, Eisgruber H, Korkeala H, Stolle A. Ribotyping for strain characterization of *Clostridium perfringens* isolates from food poisoning cases and outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3992-4.
45. Cowden JM, Wall PG, Adak G, Evans H, Le Baigue S, Ross D. Outbreaks of foodborne infectious intestinal disease in England and Wales: 1992 and 1993. *Commun Dis Rep CDR Rev* 1995;5:109-17.
46. Springer S, Selbitz HJ. The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a *Clostridium perfringens* toxoid vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;24:333-6.
47. Uzal FA, Pasini MI, Olacchea FV, Robles CA, Elizondo A. An outbreak of enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* type D in goats in Patagonia. *Vet Rec* 1994;135:279-80.
48. Wernery U, Seifert HS, Billah AM, Ali M. Predisposing factors in enterotoxemias of camels (*Camelus dromedarius*) caused by *Clostridium perfringens* type A. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1991;44:147-52.
49. Rozengurt N, Sanchez S. Duodenal adenomas in Balb/c mice monoinfected with *Clostridium perfringens*. *J Comp Pathol* 1999;121:217-25.
50. *Clostridium perfringens* gastroenteritis associated with corned beef served at St. Patrick's Day meals—Ohio and Virginia, 1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994;43:143-4.
51. Khatib R, Naber M, Shellum N, Ashton L, Knowles K, Giardina V, et al. A common source outbreak of gastroenteritis in a teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994;15:534-5.
52. Roach RL, Sienko DG. *Clostridium perfringens* outbreak associated with minestrone soup. *Am J Epidemiol* 1992;136:1288-91.
53. Pollock AM, Whitty PM. Crisis in our hospital kitchens: ancillary staffing levels during an outbreak of food poisoning in a long stay hospital. *BMJ* 1990;300:383-5.
54. Payment P. Poor efficacy of residual chlorine disinfectant in drinking water to inactivate waterborne pathogens in distribution systems. *Can J Microbiol* 1999;45:709-15.