



FACT SHEET

Clostridium perfringens Toxine

1. Das Bakterium *C.perfringens*

1.1. Das Bakterium

C. perfringens ist ein gram-positives Bakterium das für eine Vielfalt von Krankheiten für Mensch und Tier verantwortlich ist². Bekannt ist es vor allem als Erreger des Gasbrandes, in 90 % der Fälle ist *C. perfringens* dafür verantwortlich. Es handelt sich um ein stäbchenförmiges und unbewegliches Bakterium². *C. perfringens* sind Überlebenskünstler, die Sporen bilden und so auch widrigste Umweltbedingungen überstehen können⁴. Die Bakterien können im Boden, Lebensmittel sowie im Darm von Mensch und Tier gefunden werden⁶. Es ist allerdings nicht bekannt, wo die für den Menschen speziell gefährlichen *C. perfringens*-Typen gefunden werden können, was eine gezielte Vermeidung erschwert⁷. Die Toxinproduzierenden Bakterien werden hauptsächlich über kontaminierte Lebensmittel, Getränke, Erdreich und Kot aufgenommen⁸.

1.2. Nomenklatur

C. perfringens verfügt über ein Vielzahl von Toxinen, wobei unterschiedliche Stämme nur bestimmte Toxine bilden². Die Produktion der vier potentesten Toxine, α - (alpha), β - (beta), ϵ - (epsilon) und ι - (iota) Toxine, erlaubt deshalb eine Einteilung in die fünf Typen A bis E².

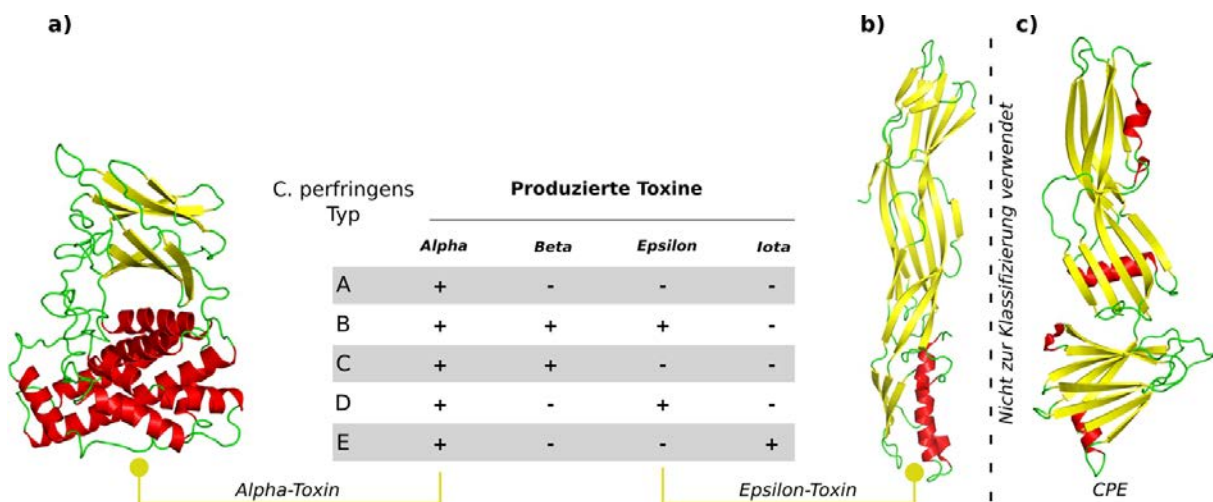


Fig. 1: Klassifizierung von *C. perfringens* in Typen A – E. Das Bakterium *C. perfringens* ist in der Lage eine Vielzahl von Toxinen zu produzieren. Die Einteilung in Unterklassen (Typen) erfolgt anhand der kombinatorischen Produktion der vier Typisierungstoxine: Alpha-, Beta-, Epsilon- und Iotatoxine (**Tabelle**). Zur Visualisierung wurden die Kristallstrukturen des Alphatoxins (**a**) [PDB: 1CA1]¹ und des Epsilontoxins (**b**) [PDB: 1UYJ]³ abgebildet. Diese Einteilung wird ausschliesslich zur Kategorisierung der Bakterienisolate verwendet und bezieht sich nicht auf die Eigenschaften der Toxine selbst. Dies wird unter anderem durch das *C. perfringens* Enterotoxin, CPE [PDB: 3ZIX]⁵, illustriert, das grosse Ähnlichkeiten aufweist, aber nicht zur Typisierung verwendet wird (**c**). In den Proteinstrukturen wurden α -Helices rot, β -Faltblätter gelb und Loops grün dargestellt.

Dies basiert auf der Eigenschaft der Bakterien charakteristische Kombinationen der vier Toxine zu synthetisieren². Diese Einteilung beruht auf den ursprünglichen Neutralisationsversuchen nach Wilsdon et al. 1931⁹. Dabei wurden die von einer Bakterienkultur produzierten Toxine zusammen mit verschiedenen tierischen Antiseren an Labortiere verabreicht und deren Krankheitsverlauf beobachtet⁹. Obwohl zwischenzeitlich 16 *C. perfringens* Toxine bekannt sind, hat diese Methode heute noch ihre Gültigkeit¹⁰.

2. Toxine von *C. perfringens*

Mit der Ausnahme von α -Toxin agieren die hier beschriebenen Toxine als Porenbildner. Diese membrandurchspannenden Komplexe werden nach heutigem Wissenstand aus bis zu sieben Toxinproteinen gebildet und ermöglichen den Austausch kleiner Moleküle (< ca. 1 kDa)¹¹. Die toxische Wirkung beruht dabei meistens auf dem Verlust der Barrierewirkung zwischen der Zelle und dem umgebenden Milieu.

2.1. CPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin)

Das CPE Toxin ist für einen Grossteil der menschlichen Lebensmittelvergiftungen verantwortlich und deshalb das am eingehendsten untersuchte Vertreter der *C-perfringens*-Toxine¹². Das Protein besteht aus 319 Aminosäuren (AS) und weist ein Molekulargewicht von 35 kDa auf¹³. Nach der Produktion, zumeist im Darm, vermag das CPE-Toxin an Oberflächenproteine des Dünndarmepithels zu binden, wo sich mehrere Toxine zu einem Komplex zusammenlagern¹⁴. Diese ändern die Membranpermeabilität durch die Bildung von porenartigen Strukturen^{15,16}. Dieser unkontrollierte Austausch führt zum Zelltod und resultiert in Entzündungen und Gewebeschäden in den betroffenen Körperregionen¹⁷. Eine Lebensmittelvergiftung durch *C. perfringens* Typ A kann alle Menschen betreffen⁷. Die Immunreaktion schützt nicht nachweislich gegen eine erneute Infektion¹⁸. Die beschriebene Porenbildung verläuft bei anderen Toxinen von *C. perfringens* sehr ähnlich¹¹.

2.2. α -Toxin

Das α -Toxin besteht aus 370 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 43 kDa¹. Das Protein agiert als Phospholipase, ein Enzym welches ein breites Spektrum an eukaryotischen Phospholipiden zu zersetzen vermag¹. Phospholipide sind ein essentieller Bestandteil von Zellmembranen in Mensch und Tier. Eine α -Toxinvergiftung führt speziell in Blutzellen zu einem Abbau der Membranstrukturen¹⁹. Diese Beeinträchtigung der Blutversorgung kann zu schweren Gewebeschäden führen^{12,20}.

2.3. β -Toxin

Das Beta-Toxin ist ein porenbildendes Toxin¹¹ mit einer Länge von 336 AS²¹ und einem Molekulargewicht von 35 kDa²². Das Gen liegt auf einem Plasmid²³ und kommt in *C. perfringens* Typ B und C vor. Die Folgen einer Infektion ist eine nekrotische Enteritis oder umgangssprachlich „Darmbrand“. Die Erkrankung zeichnet sich durch schwere Entzündungen und Gewebeschäden im Dünndarm aus^{24,25}. Das Toxin aus den zwei Bakterientypen B und C ist stark konserviert und bis auf den Austausch einer einzelnen Aminosäure identisch²⁶.

Mutationsstudien haben zudem gezeigt, dass der Austausch einzelner Aminosäuren die Toxizität des Proteins stark beeinflusst²⁷. Dieser Umstand ist im Hinblick auf mögliche Impfstoffe potentiell interessant, da inaktive Varianten des Toxins zur Immunisierung verwendet werden könnten. Das Toxin wird leicht durch Proteasen abgebaut.

2.4. β_2 -Toxin

Obwohl der Name auf einen Bezug zu dem β -Toxin schliessen lässt, zeigen diese beiden Toxine keine Sequenzhomologien²⁸. Das porenbildende β_2 -Toxin¹¹ wird als 265 AS Protein produziert und beinhaltet an seinem N-Terminus eine 30 AS Signalsequenz, die die Exkretion vermittelt^{28,29}. Das sekretierte Protein hat ein Molekulargewicht von 28 kDa³⁰. Das β_2 Toxin wird auf einem Plasmid codiert³⁰ und kann in allen *C. perfringens*-Typen gefunden werden²⁹. Die Toxinproduktion wird durch das ViR/VisR System kontrolliert und erreicht in

Kultur ihr maximales Level am Ende der exponentiellen Wachstumsphase³¹. Das Protein wird ebenfalls leicht durch Proteasen abgebaut, die das Toxin in zwei ähnlich grosse Fragmente zerteilen³⁰.

Die Toxizität in Zelllinien liegt bei einer Konzentration von 0.2 – 20 µg/ml²⁸. Intravenöse Injektion in Mäusen ergab einen LD₅₀ Wert von 500 ng/kg¹². Es wird vermutet, dass das β₂-Toxin ebenfalls als porenbildendes Protein agiert.²⁴

2.5. ε-Toxin

2.5.1. Proteinstruktur des Toxins

Das porenbildende ε-Toxin¹¹ weist ein Molekulargewicht von 33 kDa^{10,24} auf und ist das potenteste Toxin das von *C. perfringens* produziert wird. Nach den Botulinum- und Tetanusneurotoxinen ist es das dritt-gefährlichste Clostridiumtoxin²⁴ und die viert-giftigste Substanz, die bis heute bekannt ist⁸. Das ε-Toxin wurde als kausale Ursache der Infektion durch *C. perfringens* Typ B und D bestätigt⁸. Studien in verschiedenen Tierarten konnten zeigen, dass das aufgereinigte und intravenös injizierte ε-Toxin dieselben Symptome hervorzurufen vermag, wie die natürliche bakterielle Erkrankung^{32,33}. Die durch ε-Toxin gebildeten Poren haben eine Heptamerstruktur, die den freien Austausch von Ionen und Molekülen, welche eine Masse von 1 kDa nicht überschreiten, erlauben³⁴.

Das porenbildende⁸ ε-Toxin wird als Prototoxin produziert (LD_{50, Maus} = 70 µg / kg³⁵). Aus dieser inaktiven Form geht im Darmtrakt nach der Abspaltung von N- und C-terminalen Aminosäuren das aktive ε-Toxin hervor^{35 21,34} (29 kDa, LD₅₀ = 65 ng/kg³⁵). Diese Aktivierung wird durch Enzyme gesteuert, die sowohl vom Menschen wie auch vom Bakterium selbst produziert werden, wobei beide einzeln bereits ausreichend sind³⁵. Die Toxizitätswerte beziehen sich auf intravenöse Verabreichung des Toxins an Mäuse und einer Auswertung nach 24 Stunden.

Auf Grund seiner enormen Potenz wird das Toxin als potentieller Biokampfstoff eingestuft²⁴.

2.5.2. Aufnahme und Verteilung im Körper

Das Toxin begünstigt seine eigene Aufnahme im Verdauungstrakt und kann so in den Blutstrom übertreten^{24,36}. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist dabei unklar, da das Darmepithel nicht stark verändert wird⁸. Dies deutet darauf hin, dass das Toxin neben der direkten Zellschädigung auch spezifisch die Durchlässigkeit der Darmwand modulieren kann, indem es die Verbindungen zwischen den Zellen abbaut³⁷. Einmal im Kreislaufsystem reichert sich das Toxin gezielt in seinen Zielorganen an. Nagahama et al. 1991³⁸ konnte mit Hilfe von radioaktivem ε-Toxin dessen Verteilung in Mäusen beobachten. Insbesondere die Nieren und das Gehirn zeigten stark erhöhte Toxinwerte^{38,39}. Diese Aufnahme ins Gehirn verläuft nach heutigem Wissensstand zumindest teilweise über einen spezifischen Aufnahmeweg und nicht durch eine generelle Schädigung der Blut-Hirnschranke³⁸. Schlussendlich schädigt das Toxin dabei das mikrovaskuläre Endothel wodurch es zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und dann im zweiten Schritt zum Hirnödem kommen kann⁵⁸. Dies wird durch Beobachtungen an Mäusen gestützt, die gezeigt haben, dass das Prototoxin die darauffolgende Aufnahme des aktiven Toxins verzögert³⁸. Vermutlich binden beide an Rezeptoren der Blut-Hirn Schranke, doch nur das aktive Toxin vermag die Endothelzellen zu durchqueren⁴⁰. Hirschberg et al. 2009⁴¹ zeigten in Ratten, dass diese Eigenschaft genutzt werden kann, um das Gehirn für das Krebsmedikament Bleomycin besser zugänglich zu machen. Das ε-Toxin ist das einzige *C.perfringens*-Toxin, das die Blut-Hirnschranke zu überqueren vermag⁸.

2.5.3. Schädigende Auswirkungen auf den Organismus

In den Zielgeweben führt das ε-Toxin zu Ödemen und Blutungen^{22,42}. Im speziellen Fall des Gehirns zeigen sich in Folge Symptome wie Zuckungen und schwere Muskelkrämpfe der Nacken- und Rückenmuskulatur auf. Dies führt bei hohen Konzentrationen zu einem Durchbiegen und Überstrecken der Rückenmuskulatur. Die Symptome sind wahrscheinlich eine Folge des Hirnödems und der gesteigerten Transmitteraktivität⁵⁸. Tierstudien haben gezeigt, dass das ε-Toxin Oberflächenrezeptoren von bestimmten Nervenzellen und unterstützend

agierende Gliazellen erkennt⁸. Das ϵ -Toxin stimuliert gezielt die exzessive Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat⁸. Durch die hohen Glutamatkonzentrationen werden die Hirnzellen überreizt, was zum Absterben des betroffenen Nervengewebes führt^{43,44}. Die beschriebenen Symptome wie Zuckungen und Krampfanfälle spiegeln die Überreizung des Zentralen Nervensystems wieder⁸. Das Toxin kann dadurch sowohl direkt wie auch indirekt das Gehirn des Betroffenen schädigen.

Eine Studie aus den 60er Jahren wies ϵ -Toxin-produzierende Bakterien auch im menschlichen Verdauungstrakt nach⁴⁵. Trotzdem werden ϵ -Toxinvergiftungen nicht mit normalerweise auftretenden menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht^{46,47}. In Ausnahmefällen fielen geschwächte Patienten einer Infektion durch *C. perfringens* und ϵ -Toxin Vergiftung zum Opfer⁴⁸.

2.6. I-Toxin

Das Iotatoxin ist ein binäres Toxin, das aus zwei getrennten Polypeptidketten besteht, dem ι_a - und ι_b -Toxin⁴⁹. Die beiden Toxine werden ausschliesslich vom *C. perfringens* Typ E produziert⁵⁰. Sie sind nicht immunologisch verwandt und haben unterschiedliche physikalische Eigenschaften⁴⁹. Das ca. 48 kDa ι_a -Toxin ist bis 85°C uneingeschränkt funktionsfähig, während das ca. 70 kDa ι_b -Toxin ab 45°C stark an Aktivität einbüsst⁴⁹. Die beiden Toxine wirken synergistisch⁴⁹ und werden zusammen als I-Toxin bezeichnet. Das ι_a -Toxin schädigt Strukturen im Zellinneren und das ι_b -Toxin ermöglicht dessen Aufnahme durch die Bildung von Poren¹¹ in empfänglichen Zelltypen. Das Iotatoxin erhöht unter anderem die Durchlässigkeit des Gefässsystems⁵¹.

3. Analytik

Die Analytik der *C. perfringens* Toxine fokussiert sich fast ausschließlich auf das ϵ -Toxin⁵⁸.

3.1. Funktionstest (in vitro / in vivo)

Der Neutralisationsassay des Toxins mit Hilfe von Antiserum wird als Standardmethode verwendet, um das Toxin nachzuweisen und zu klassifizieren. Der Tierversuch hat den Vorteil, dass neben der Typisierung auch die biologische Aktivität des Toxins gemessen wird. Eine Alternative zum Tierversuch stellt das Neutralisationsexperiment mit MDCK-Zellen in Kultur dar (15 ng ϵ -Toxin / ml)⁵².

3.2. ELISA

Clostridium perfringens Toxin ELISA KIT, Bio-X Diagnostics, Belgien. Der Hersteller gibt an, dass das Kit sowohl für die Analyse von Bakterienkulturen sowie für Umweltproben geeignet ist. Monoklonale Antikörper sind dabei für die Toxine alpha, beta und epsilon sowie für Oberflächenstrukturen des *C. perfringens*-Bakteriums vorhanden. Das Kit wurde in wissenschaftlichen Arbeiten verwendet⁵³ und erlaubt einen zuverlässigen Toxinnachweis (Nachweisgrenze für ϵ -Toxin von 0,075 MLD₅₀/ml⁴⁷)

3.3. LC-MS Nachweis

In diesem massenspektrometrischen Assay wird in einem ersten Schritt das in der biologischen Probe enthaltene Toxin konzentriert. Dazu werden mit Hilfe spezifischer Antikörper die Toxine auf Beads angereichert. ϵ -Toxin konnte mit diesem Verfahren bis zu einer Konzentration von 5ng/ml in Milch und Serum nachweisen werden⁵⁴.

3.4. Komplikationen beim Nachweis von *C.-perfringens*-Toxinen

Bei der Analytik von Toxinvergiftungen, denen eine Infektion vorausgeht und bei denen es sich somit um klassische Toxikoinfektionen handelt, ist grosse Vorsicht geboten. Hier werden häufig falsch positive wie falsch negative Diagnosen gestellt. Als Beispiel kann hier der Nachweis des *C. perfringens*-Enterotoxins (CPE) angeführt werden. Um das Problem der Keimung zu umgehen, kann die toxinkodierende DNA mit Hilfe der PCR nachgewiesen werden⁵⁶. Die Anwesenheit des *CPE*-Gens genügt allerdings nicht für eine abschliessende

Diagnose einer CPE Vergiftung⁵⁶. CPE-positive Bakterienstämme können im Stuhl eines Patienten vorkommen, ohne für eine Vergiftung verantwortlich zu sein^{7,57}. Es gibt keinen gut etablierten Tierversuch für den Enterotoxin-Nachweis. Tierversuche im Sinne von Belastungsversuchen sind erforderlich, um die diagnostische Aussagekraft der jeweiligen Ansätze zu validieren⁵⁸.

4. Bibliographie

- (1) Naylor, C. E.; Eaton, J. T.; Howells, A.; Justin, N.; Moss, D. S.; Titball, R. W.; Basak, A. K. *Nat Struct Biol* **1998**, *5*, 738.
- (2) McClane, B. A.; Rood, J. I.; Bahl, H.; DURRE, P. *Clostridia: biotechnology and medical applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2001**, 169.
- (3) Cole, A. R.; Gibert, M.; Popoff, M.; Moss, D. S.; Titball, R. W.; Basak, A. K. *Nature structural & molecular biology* **2004**, *11*.
- (4) Doyle, M. *Foodborne bacterial pathogens*; CRC Press, 1989.
- (5) Briggs, D. C.; Naylor, C. E.; Smedley, J. G., 3rd; Lukoyanova, N.; Robertson, S.; Moss, D. S.; McClane, B. A.; Basak, A. K. *J Mol Biol* **2011**, *413*, 138.
- (6) Wen, Q.; McClane, B. A. *Applied and environmental microbiology* **2004**, *70*, 2685.
- (7) Doyle, M. P.; Beuchat, L. R. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*; American Society for Microbiology Press, 2007.
- (8) Wioland, L.; Dupont, J. L.; Bossu, J. L.; Popoff, M. R.; Poulain, B. *Toxicon* **2013**, *75*, 122.
- (9) Wilsdon, A. *2nd Report Direct. Inst. Anim. Path. University Cambridge* **1931**, 53.
- (10) McDonel, J. L. *Pharmacol Ther* **1980**, *10*, 617.
- (11) Popoff, M. R. *Anaerobe* **2014**, *30*, 220.
- (12) Songer, J. G. *Clin Microbiol Rev* **1996**, *9*, 216.
- (13) Czeuczulin, J. R.; Hanna, P.; McClane, B. *Infection and immunity* **1993**, *61*, 3429.
- (14) Wieckowski, E. U.; Wnek, A. P.; McClane, B. A. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 10838.
- (15) McClane, B. A. *Toxicology* **1994**, *87*, 43.
- (16) Hardy, S.; Denmead, M.; Parekh, N.; Granum, P. *Journal of medical microbiology* **1999**, *48*, 235.
- (17) Sherman, S.; Klein, E.; McClane, B. A. *Journal of diarrhoeal diseases research* **1994**, 200.
- (18) Birkhead, G.; Vogt, R.; Heun, E.; Snyder, J.; McClane, B. *Journal of clinical microbiology* **1988**, *26*, 471.
- (19) Titball, R. W. *Microbiological reviews* **1993**, *57*, 347.
- (20) Rood, J. I.; Cole, S. T. *Microbiol Rev* **1991**, *55*, 621.
- (21) Hunter, S. E.; Brown, J. E.; Oyston, P. C.; Sakurai, J.; Titball, R. W. *Infect Immun* **1993**, *61*, 3958.
- (22) Hunter, S. E.; Clarke, I. N.; Kelly, D. C.; Titball, R. W. *Infect Immun* **1992**, *60*, 102.
- (23) Katayama, S.; Dupuy, B.; Daube, G.; China, B.; Cole, S. T. *Mol Gen Genet* **1996**, *251*, 720.
- (24) Smedley, J. G., 3rd; Fisher, D. J.; Sayeed, S.; Chakrabarti, G.; McClane, B. A. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **2004**, *152*, 183.
- (25) Lawrence, G. *The clostridia: molecular biology and pathogenesis*. Academic Press, San Diego, CA **1997**, 197.
- (26) Steinhorsdottir, V.; Fridriksdottir, V.; Gunnarsson, E.; Andresson, O. S. *FEMS Microbiol Lett* **1995**, *130*, 273.
- (27) Steinhorsdottir, V.; Fridriksdottir, V.; Gunnarsson, E.; Andresson, O. S. *FEMS Microbiol Lett* **1998**, *158*, 17.
- (28) Gibert, M.; Jolivet-Reynaud, C.; Popoff, M. R. *Gene* **1997**, *203*, 65.
- (29) Bueschel, D. M.; Jost, B. H.; Billington, S. J.; Trinh, H. T.; Songer, J. G. *Vet Microbiol* **2003**, *94*, 121.
- (30) Shimizu, T.; Ohtani, K.; Hirakawa, H.; Ohshima, K.; Yamashita, A.; Shiba, T.; Ogasawara, N.; Hattori, M.; Kuhara, S.; Hayashi, H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 996.
- (31) Ohtani, K.; Kawsar, H. I.; Okumura, K.; Hayashi, H.; Shimizu, T. *FEMS Microbiol Lett* **2003**, *222*, 137.
- (32) Uzal, F. A.; Kelly, W. R.; Morris, W. E.; Assis, R. A. *J Comp Pathol* **2002**, *126*, 71.
- (33) Uzal, F. A.; Kelly, W. R. *J Comp Pathol* **1997**, *116*, 63.
- (34) Petit, L.; Maier, E.; Gibert, M.; Popoff, M. R.; Benz, R. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 15736.
- (35) Minami, J.; Katayama, S.; Matsushita, O.; Matsushita, C.; Okabe, A. *Microbiol Immunol* **1997**, *41*, 527.
- (36) Losada-Eaton, D. M.; Uzal, F. A.; Fernandez Miyakawa, M. E. *Toxicon* **2008**, *51*, 1207.
- (37) Goldstein, J.; Morris, W. E.; Loidl, C. F.; Tironi-Farinati, C.; McClane, B. A.; Uzal, F. A.; Fernandez Miyakawa, M. E. *PLoS One* **2009**, *4*, e7065.
- (38) Nagahama, M.; Sakurai, J. *Toxicon* **1991**, *29*, 211.
- (39) Tamai, E.; Ishida, T.; Miyata, S.; Matsushita, O.; Suda, H.; Kobayashi, S.; Sonobe, H.; Okabe, A. *Infect Immun* **2003**, *71*, 5371.
- (40) Soler-Jover, A.; Dorca, J.; Popoff, M. R.; Gibert, M.; Saura, J.; Tusell, J. M.; Serratosa, J.; Blasi, J.; Martin-Satue, M. *Toxicon* **2007**, *50*, 530.
- (41) Hirschberg, H.; Zhang, M. J.; Gach, H. M.; Uzal, F. A.; Peng, Q.; Sun, C. H.; Chighvinadze, D.; Madsen, S. J. *J Neurooncol* **2009**, *95*, 317.
- (42) Petit, L.; Gibert, M.; Gouch, A.; Bens, M.; Vandewalle, A.; Popoff, M. R. *Cell Microbiol* **2003**, *5*, 155.
- (43) Slemmer, J. E.; De Zeeuw, C. I.; Weber, J. T. *Prog Brain Res* **2005**, *148*, 367.
- (44) Matute, C.; Domercq, M.; Sanchez-Gomez, M. V. *Glia* **2006**, *53*, 212.
- (45) Gleeson-White, M. H.; Bullen, J. J. *Lancet* **1955**, *268*, 384.
- (46) Alves, G. G.; de Ávila, R. A. M.; Chávez-Olórtegui, C. D.; Lobato, F. C. F. *Anaerobe* **2014**, *30*, 102.
- (47) Stiles, B. G.; Barth, G.; Barth, H.; Popoff, M. R. *Toxins (Basel)* **2013**, *5*, 2138.
- (48) Miller, C.; Florman, S.; Kim-Schluger, L.; Lento, P.; De La Garza, J.; Wu, J.; Xie, B.; Zhang, W.; Bottone, E.; Zhang, D.; Schwartz, M. *Liver Transpl* **2004**, *10*, 1315.
- (49) Stiles, B. G.; Wilkins, T. D. *Infect Immun* **1986**, *54*, 683.
- (50) Stiles, B. G.; Wilkins, T. D. *Toxicon* **1986**, *24*, 767.
- (51) Craig, J. P.; Miles, A. A. *J Pathol Bacteriol* **1961**, *81*, 481.
- (52) Payne, D. W.; Williamson, E. D.; Havard, H.; Modi, N.; Brown, J. *FEMS Microbiol Lett* **1994**, *116*, 161.
- (53) Layana, J. E.; Fernandez Miyakawa, M. E.; Uzal, F. A. *Anaerobe* **2006**, *12*, 204.
- (54) Seyer, A.; Fenaille, F.; Feraudet-Tarisse, C.; Volland, H.; Popoff, M. R.; Tabet, J. C.; Junot, C.; Becher, F. *Anal Chem* **2012**, *84*, 5103.
- (55) Kokai-Kun, J. F.; Songer, J. G.; Czeuczulin, J. R.; Chen, F.; McClane, B. A. *Journal of clinical microbiology* **1994**, *32*, 2533.
- (56) Kokai-Kun, J. F.; Songer, J. G.; Czeuczulin, J. R.; Chen, F.; McClane, B. A. *J Clin Microbiol* **1994**, *32*, 2533.
- (57) Saito, M. *Journal of Food Protection* **1990**, *53*, 115.
- (58) Gessler, F. miprolab, schriftliche Mitteilung **2016**.