

Botulismus bei Mensch und Tier

DVG-Konsiliarlabor für *Clostridium botulinum*/Botulinumtoxin in Lebensmitteln am RKI

Martin B. Dorner*, Paulin Dettmann**, Sylvia Worbs***, Brigitte G. Dorner****

* Dr. rer. nat., Dipl.-Chem. / **Tierärztin / *** Dr. rer. nat., Dipl.-Biochem. / **** Dr. rer. nat., Dir. und Prof., Dipl.-Chem.

Das Konsiliarlabor für *Clostridium botulinum*/Botulinumtoxin in Lebensmitteln ist im Fachgebiet „Biologische Toxine (ZBS3)“ des Robert Koch-Instituts (RKI) angesiedelt und seit 01.07.2017 von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) benannt. Das Fachgebiet beherbergt seit 2014 auch das Konsiliarlabor für Neurotoxin-produzierende Clostridien (Botulismus, Tetanus) des Bundesministeriums für Gesundheit [1].

Seit seiner Gründung 2003 beschäftigt sich das Fachgebiet „Biologische Toxine“ mit hochmolekularen Proteintoxinen, die im Zusammenhang mit Bioterrorismus relevant sind. Für die Konsiliartätigkeit stehen Erkrankungen bei Mensch und Tier im Fokus, die durch Botulinum-Neurotoxine und Tetanus-Neurotoxin ausgelöst werden. Verschiedene Nachweisverfahren sind nach ISO 15189¹ sowie ISO 17025² für klinische Proben, Lebensmittel- und Umweltproben akkreditiert. Das Fachgebiet ist Ansprechpartner für Tierärzte, Ärzte, Mitarbeiter des öffentlichen Gesundheitsdienstes sowie für Sicherheitsbehörden. Die gleichzeitige Tätigkeit als Konsiliarlabor im humanen Bereich sowie im Veterinär- und Lebensmittelbereich ist ungewöhnlich, liefert aber entscheidende Synergieeffekte bei so seltenen Erkrankungen wie Botulismus und Tetanus, ganz im Sinne des One-Health-Konzepts.

Botulismus ist gleichermaßen bedeutsam für Tier und Mensch mit Überschneidungen im Human-, Veterinär- sowie Lebensmittelbereich. Die seltene, lebensbedrohliche Erkrankung wurde von Justinus Kerner (1786–1862) im frühen 19. Jahrhundert beschrieben und trat bei Menschen nach dem Verzehr von Wurst auf, was der Krankheit den Namen Botulismus gab (von lateinisch *botulus*: Wurst). Kerner zeigte ebenfalls, dass es bei Tieren zu einem ähnlichen Krankheitsgeschehen kommt. Vorwiegend wird Botulismus bei Nutztieren wie Geflügel, Wiederkäuern, Pferden, Pelztieren und Schweinen, aber auch bei Zoo- und Zirkustieren beobachtet [2]. Oft gehen diese Fälle auf von Menschen hergestellte Futtermittel (z. B. Silage), verdorbene Lebensmittel oder unsachgemäß gelagerte Tierkörper (als Futter) zurück. Bei Silage sind häufige Auslöser eingetragene Tier-

kadaver, die ein für den Erreger geeignetes Milieu in der Silage schaffen. Neben Einzelfällen kommt es gerade bei Rindern, Geflügel und Pelztieren zu größeren Ausbrüchen von Duzenden bis zu Tausenden Tieren [3,4]. Natürliche Botulismusausbrüche bei Wasservögeln werden regelmäßig durch den Verzehr Toxin-haltiger Maden bzw. Weichtiere oder Fischkörper ausgelöst. In Gebieten mit Phosphor-/Mineralmangel (z. B. in Südafrika) wird Botulismus bei Rindern und Schafen nach Verzehr von Knochen verstorbener Tiere beobachtet (Osteophagie). Nekrophagen und Karnivore sind in der Regel nicht betroffen, obgleich sporadisch Fälle bei Hunden und Einzelfälle bei Katzen durch den Verzehr von kontaminierten (Vogel-)Kadavern berichtet wurden.

Botulismus wird durch die Botulinum-Neurotoxine (BoNTs) ausgelöst, die von *Clostridium (C.) botulinum* (Abb. 1) sowie einigen anderen Clostridien produziert werden und die giftigsten bekannten Substanzen der Erde darstellen. BoNTs werden in acht Serotypen, A bis H, und in mehr als 40 Subtypen und Mosaikvarianten unterteilt [5]. Es sind Endoproteasen, die an der neuromuskulären Endplatte durch Spaltung der neuronalen SNARE³-Proteine die Neurotransmitter-Freisetzung blockieren; dies führt zur Paralyse des innervierten Muskels (Abb. 2). Die Aufnahme der BoNTs erfolgt in der Regel oral als präformiertes Toxin (Intoxikation). Beim Menschen sind neben diesem Lebensmittelbotulismus zwei weitere Formen beschrieben, die Toxikoinfektionen darstellen: Beim Säuglingsbotulismus resultiert die orale Aufnahme des Erregers bzw. der Sporen bei Säuglingen im ersten Lebensjahr in Abwesenheit einer kompetitiven Darmflora in einem Auskeimen der Sporen und einer Toxinproduktion im Darm. Wundbotulismus entsteht durch den Eintrag des Erregers in tiefe, anaerobe Wunden mit anschließender Auskeimung und Toxinproduktion.

BoNTs werden von sechs verschiedenen *Clostridium*-Spezies (*C. botulinum* Gruppe

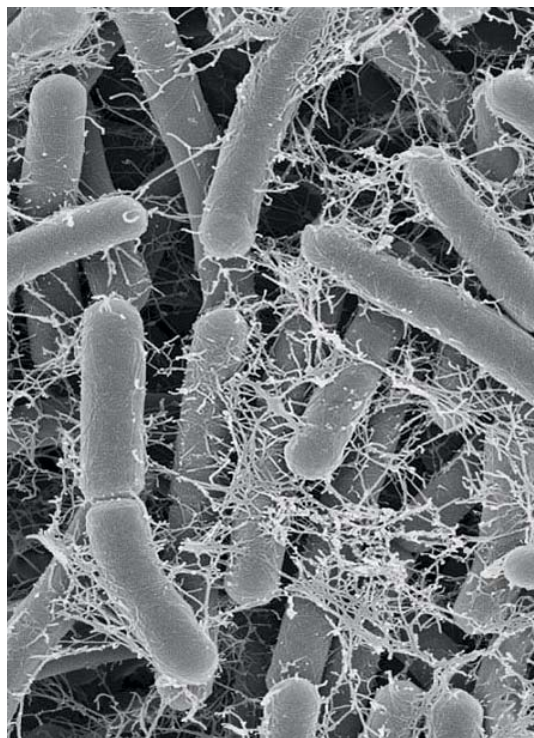


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Clostridium botulinum*.

I–IV, *C. baratii* und *C. butyricum*) produziert, allesamt grampositive, obligat anaerobe sporenbildende Bakterien. Sie kommen ubiquitär vor, Hauptreservoir sind Böden und marine Sedimente. Nicht alle Isolate tragen den BoNT-Gencluster, häufig sind atoxische Vertreter anzutreffen. Aufgrund der Heterogenität der BoNT-produzierenden *Clostridium*-Spezies ist eine Identifizierung pathogener Stämme durch mikrobiologische Standardverfahren (z. B. kulturell, 16S-rDNA-Sequenzierung, MALDI-Biotyper) nicht möglich. Einzig der molekularbiologische oder biochemische Toxinnachweis erlaubt eine eindeutige Zuordnung.

Klinisches Bild des Botulismus und Assoziation mit Toxin-Serotypen

Das klinische Bild des Botulismus ist bei Mensch und Tier ähnlich. Es ist durch eine meist mit den kranialen Nerven beginnende, absteigende schlaffe Lähmung gekennzeichnet.

¹ Norm DIN EN ISO 15189 zur Akkreditierung medizinischer Laboratorien – Anforderungen an die Qualität und Kompetenz

² DIN EN ISO/IEC 17025 definiert die allgemeinen Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien

³ Engl. Abkürzung für: soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor

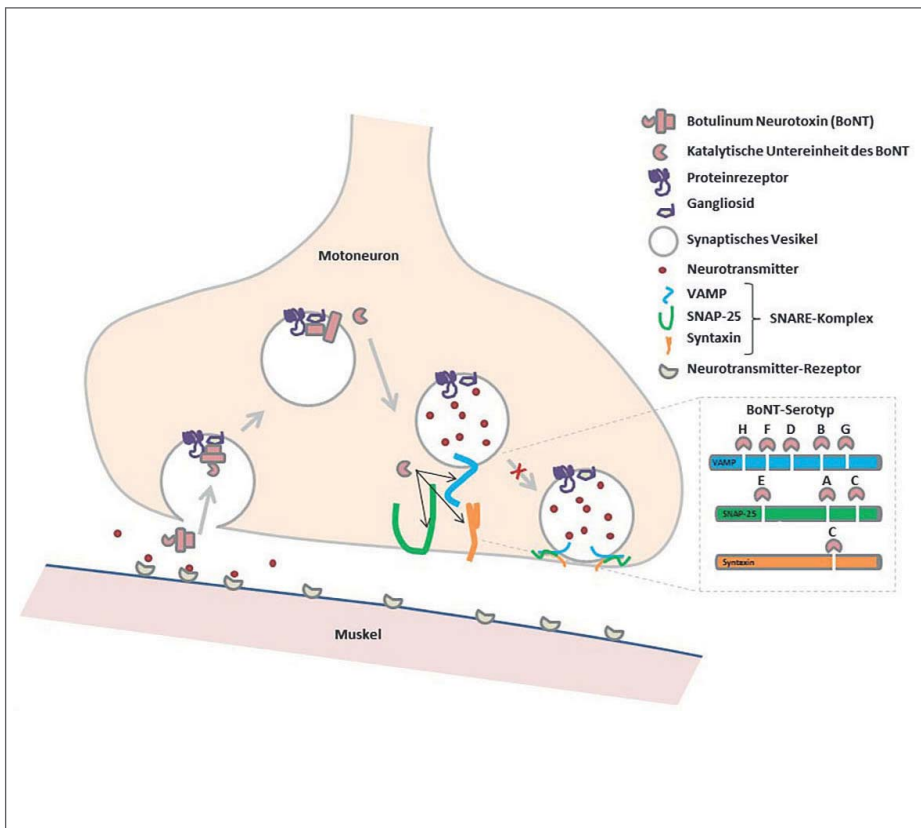


Abb. 2: Wirkungsweise der BoNTs an der neuromuskulären Endplatte: Nach Bindung an Protein- und Gangliosid-Rezeptoren werden die BoNTs durch Endozytose aufgenommen. Die katalytische Untereinheit der Toxine wird durch einen molekular noch nicht verstandenen Mechanismus aus dem Vesikel in das Zytosol transloziert. Hier spaltet die katalytische Untereinheit je nach Serotyp eines der drei SNARE-Komplexproteine VAMP, SNAP-25 oder Syntaxin an einer spezifischen Position. Durch die Spaltung wird die Ausbildung des SNARE-Komplexes, der als „molekularer Reißverschluss“ die Fusion von Transmitter-beladenen Vesikeln mit der synaptischen Membran vermittelt, verhindert. Dies führt zur Blockade der Neurotransmitterfreisetzung und zur Paralyse des innervierten Muskels.

net, die innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen nach oraler Toxinaufnahme auftritt. Betroffen sind anfänglich Augen-, Zungen-, Kau- und Schluckmuskulatur, die sich in Ptosis, vermindertem Zungentonus, erschwertem Kauen und Dysphagie sowie Hypersalivation darstellen und oft mit Heiserkeit und Mattigkeit bei der Lautgebung einhergehen. Die Patienten sind in der Regel afebril. Aufgrund der einhergehenden Parese der gastrointestinalen Muskulatur wird häufig Obstipation beobachtet. In fortschreitendem Verlauf sind zudem die Extremitäten betroffen (unsteter Gang, ataktische Bewegung, Festliegen bzw. Flugunfähigkeit). Bei weiterer Progredienz tritt der Tod durch Ersticken ein. Bei Vögeln kann die Unfähigkeit, den Kopf zu heben (Iimberneck), stark ausgeprägt sein, betroffene Wasservögel können ertrinken.

Insbesondere bei Rindern und Pferden sind Ausbrüche oft mit Silage assoziiert, die fehlgegroren oder durch Tierkadaver kontaminiert ist. Bei betroffenen Herden oder bei Geflügel ist eine sofortige Futterumstellung ratsam. Tierkadaver sind umgehend zu beseitigen, um weitere Botulismusquellen für Nutz- und Wildtiere zu entfernen.

Die **Labordiagnostik** erfolgt über den Toxin- und Erregernachweis aus Serum, Faeces, Organen sowie verdächtigen Futtermitteln. Im Magen bzw. in Futtertrögen und Futtermischmaschinen finden sich eventuell Kadaverreste. In der Sektion zeigt sich wenig Auffälliges. Der Toxinnachweis ist diagnostisch beweisend, gelingt aber nicht immer, da das Toxin rasch aus der Zirkulation entfernt wird. Am ehesten gelingt der Toxinnachweis bei Serumproben aus der frühen Phase der Intoxikation (Tag 1–3) oder aus Futterresten. Alternativ kann der Erreger nachgewiesen werden. Problematisch ist hierbei, dass sich Clostridien als ubiquitäre Bodenkeime auch vereinzelt im Kot völlig gesunder Tiere finden. Der alleinige Nachweis des Erregers ist daher kein Beweis für Botulismus und ohne eine eindeutige klinische Symptomatik nicht hinreichend [6, 7].

Bei einzelnen Tierarten ist Botulismus mit bestimmten Serotypen assoziiert, selbige können jedoch für andere Serotypen nahezu refraktär sein. **Tabelle 1** gibt eine Übersicht über die häufig vorkommenden Serotypen bei verschiedenen Tierarten.

Die **Therapieoptionen** bei Botulismus im Tier sind limitiert. Es gibt für den Veterinär-

bereich Serotyp-spezifische Antitoxine, die meist aus dem Ausland beschafft werden müssen und ggf. einer behördlichen Genehmigung bedürfen sowie die Kenntnis des Serotyps voraussetzen. Das Zeitfenster zur Behandlung durch Antitoxine beschränkt sich auf die Anfangsphase der Erkrankung. Daher bleiben meist nur symptomatisch-unterstützende Maßnahmen.

Nachweisverfahren für Botulinum-Neurotoxine

Die Labordiagnostik des Botulismus steht aufgrund der Komplexität der BoNT-Molekülfamilie mit acht Serotypen und mehr als 40 Subtypen, der extremen Toxizität der BoNTs (1 ng/kg Körpergewicht, systemische Applikation, Mensch) sowie der Toxinbildung durch sechs phänotypisch und genotypisch verschiedene *Clostridium* spp. vor großen technischen Herausforderungen [5, 6]. Als Goldstandard für den Toxinnachweis gilt immer noch der **Maus-Bioassay (DIN 10102)**, der alle Sero- und Subtypen sicher erfasst, jedoch aufgrund ethischer Bedenken bei der Durchführung des belastenden Tierversuchs in Übereinstimmung mit der aktuellen EU-Gesetzgebung dringend ersetzt werden muss. In diesem Zusammenhang bilden Fragestellungen im Bereich BoNT-produzierender Clostridien sowohl in der angewandten Forschung als auch in der Grundlagenforschung seit Jahren einen Schwerpunkt der Aktivitäten im Konsiliarlabor.

Für die Diagnostik wurde im Konsiliarlabor ein in Deutschland einmaliges Panel monoklonaler und polyklonaler Antikörper spezifisch für BoNT/A, B, C, D, E, F und H hergestellt, darunter auch Antikörper mit besonderen Eigenschaften [8–12]. Die Reagenzien wurden zur Entwicklung von modernen Array-basierten Detektionsverfahren für Toxine im stationären Laborbereich sowie für die Vor-Ort-Detektion eingesetzt und z. T. auch mit industriellen Partnern kommerzialisiert [10]. Neben rein immunologischen Verfahren wurden massenspektrometrische, funktionelle und molekularbiologische Techniken etabliert, um BoNT bzw. BoNT-produzierende Stämme im Multiplexformat aus komplexen Matrices wie human- und veterinärmedizinischen Proben, Lebens- und Futtermitteln sowie Umweltproben zu erfassen und zu typisieren [12–15]. Ausgewählte diagnostische Verfahren zum Nachweis von BoNT bzw. BoNT-produzierenden *Clostridium* spp. wurden nach ISO 15189 sowie ISO 17025 akkreditiert.

Das Konsiliarlabor arbeitet eng mit internationalen Laboratorien zum Thema Veterinär-Botulismus zusammen [16] und bietet für Ärzte, Tierärzte, Landes- und Bundesbehörden, Kliniken sowie diagnostische Laboratorien seine Referenzfähigkeit bei Verdacht auf Botulismus an. In diesem Zusammenhang werden epide-

miologische Arbeiten zum Auffinden der Infektions- bzw. Intoxikationsquelle durchgeführt. 2018 und 2019 wurden insgesamt 248 Proben von 41 Einsendern untersucht. Bei den Fallgeschehen handelte es sich u. a. um Proben mit Verdacht auf Botulismus bei Wasservögeln, Rindern und Hunden sowie um Lebensmittelbotulismus beim Menschen.

Die Erfahrungen im Bereich der Botulismusdiagnostik haben gezeigt, dass es sehr zielführend ist, **alle** mit einem Fall in Verbindung stehenden **Untersuchungsmaterialien parallel in einem Labor untersuchen** zu können. Dies schließt die zeitnahe Untersuchung von klinischen Proben (im humanen Bereich meist Serum) sowie möglicher assoziierter Lebensmittel oder Futterproben (Human- und Veterinärbereich) ein. Gerade für ein so seltenes Krankheitsbild wie Botulismus erscheint die Bündelung von human- und veterinärmedizinischer Diagnostik in einer Hand – auch im Sinne des One-Health-Aspekts – ausgesprochen sinnvoll. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund der anspruchsvollen Labordiagnostik für die komplexe Familie der BoNTs und der Heterogenität der produzierenden Erreger.

Bestätigt wurde diese Einschätzung in zwei internationalen Ausbruchsgeschehen durch kontaminierte Lebensmittel, in die das Konsiliarlabor eingebunden war: Der erste Fall war ein Ausbruch von Lebensmittel-bedingtem Botulismus nach Verzehr von kommerziellem Hummus in der Slowakei [17], bei dem das Konsiliarlabor den äußerst seltenen BoNT-Subtyp A3 aus dem Lebensmittel nachweisen konnte. Dieser Subtyp war zuvor erst ein einziges Mal im Jahr 1922 mit einem Botulismusausbruch in Schottland assoziiert. Der zweite Fall war der erste EU-weite Ausbruch von Lebensmittel-bedingtem Botulismus durch ein kommerzielles Fischprodukt (Plötze) in Deutschland und Spanien, bei dem das Konsiliarlabor in dem Fischprodukt BoNT/E3 identifizieren und den entsprechenden Erreger isolieren konnte [18]. Eine zeitnahe Diagnostik aus suspekten Lebensmitteln ist wichtig für die Initiierung von Rückrufaktionen und für weitere Entscheidungen zum vorsorgenden Verbraucherschutz.

Forschungsprojekte des Konsiliarlabors

Seit 2010 wird im Konsiliarlabor an der Erforschung einer **Tierversuchersatzmethode** zum Nachweis von BoNT aus Realproben gearbeitet. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass BoNTs aus Realproben angereichert und ihre katalytische Aktivität anschließend mithilfe von neuen Neopepitop-spezifischen monoklonalen Antikörpern in einem Suspensionsarray auf Basis der Luminex-Technik erfasst werden

Tierart	Serotypen
Geflügel (Hühner, Puten, Truthähne, Fasane)	CD (+++), C (+), E, A
Wasservögel (Enten, Schwäne etc.)	CD (++) , C (+), E (++)
Rinder	DC (+++), D (++) , CD (+), C (+), B, A
Pferde	B (++) , CD (++) , DC (++) , A, C, D
Pelztiere (Nerze, Füchse etc.)	C (+++), CD
Hunde	CD (+++), A
Fische (Forellen)	E (+++)

+++ = sehr häufig, ++ = häufig, + = selten; ohne Markierung = Einzelfälle beschrieben

Tab. 1: Botulismus bei Tieren und assoziierte BoNT-Serotypen.

[14]. Bislang konnte im Sinne eines proof-of-principle (Machbarkeitsstudie) gezeigt werden, dass die Methode zur sensitiven und spezifischen Detektion und Differenzierung von BoNT/A, B, C, D, E und F aus Serum geeignet ist.

Eine umfassende Prüfung der neuen Methode mit Toxin-dotierten Lebensmittel- und Realproben ist Gegenstand eines aktuellen Projekts des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gemeinsam mit der Medizinischen Hochschule Hannover und dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit: TiViBoNT-Projekt. Es wird erwartet, dass diese Arbeiten einen wesentlichen Beitrag zum **Ersatz des Maus-Bioassays** für die Botulismusdiagnostik leisten werden [19].

Die Methode wird zeitnah im vom Konsiliarlabor koordinierten **EU-Projekt EuroBioTox** gegen andere publizierte Tierversuchersatzmethoden sowie den Maus-Bioassay evaluiert werden (EuroBioTox-Projekt, Laufzeit 2017–2022, <https://eurobiotox.eu/>). In diesem EU-Projekt werden auch umfassende Arbeiten zur Qualitätssicherung durchgeführt, u. a. die Herstellung und Charakterisierung von BoNT-Referenzmaterialien sowie die Durchführung von internationalen Ringversuchen [8, 20, 21].

Da BoNT-Moleküle als mögliche bioterroristische Agenzien der höchsten Kategorie klassifiziert sind, werden im Konsiliarlabor Arbeiten zur **Stabilität, Dekontamination und evidenzbasierten Risikobewertung** durchgeführt. Auch die Prüfung von BoNT-haltigen Nachahmerprodukten, die nach Deutschland eingeschmuggelt oder als „Therapeutika“ kommerziell angeboten werden, fällt in dieses Aufgabengebiet. In diesem Zusammenhang wurde das Konsiliarlabor bereits aktiv, um Polizei- und Zollbehörden mit umfangreicher

Diagnostik bei der Beurteilung von „Fake“-Botoxprodukten zu unterstützen.

Im Bereich der **Pathogeneseforschung** wird die Variabilität und Funktionalität von BoNT-Subtypen anhand eigener Clostridienisolate untersucht. Hier konnten ausgehend von Botulismusfällen in Deutschland aus kontaminierten Lebensmitteln mehrere neue BoNT-Subtypen isoliert und bezüglich ihrer funktionellen Eigenschaften charakterisiert werden [22]. Ein weiterer Fokus im Bereich der Grundlagenforschung ist die Untersuchung der Adsorption von BoNT-Komplexen im Darm nach oraler Intoxikation [23]. Hier werden im Konsiliarlabor die molekularen Details der Toxin-Rezeptorbindung gemeinsam mit Kooperationspartnern im In- und Ausland untersucht. Es konnte z. B. gezeigt werden, dass für einzelne BoNT-Serotypen (A, B, DC, G) auf molekularer Ebene eine dreifache Rezeptor-Interaktion notwendig ist, um die extrem hohe biologische Aktivität der Toxine zu vermitteln [24, 25]. Diese Arbeiten tragen wesentlich zu einem vertieften Verständnis der Wirkungsweise der BoNTs *in vivo* bei und eröffnen neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von optimierten Diagnostika, BoNT-basierten Therapeutika sowie Inhibitoren zur Behandlung des Botulismus.

Literatur bei der Redaktion (dtbl@btkberlin.de)

Korrespondierende Autorin

Dr. Brigitte G. Dorner



Robert Koch-Institut,
Biologische Toxine (ZBS3),
Seestr. 10, 13353 Berlin

**Literatur zum Beitrag „Botulismus bei Mensch und Tier – DVG-Konsiliarlabor für
Clostridium botulinum/Botulinumtoxin in Lebensmitteln am RKI“,
von Martin B. Dorner, Paulin Dettmann, Sylvia Worbs, Brigitte G. Dorner,
DTBI. 9/2020, S. 1096–1100.**

- [1] https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Diagnostik_Speziallabore/Toxine/toxine-labor_node.html (zuletzt aufgerufen am 14.08.2020)
- [2] Le Maréchal C, Woudstra C, Fach P (2016): Botulism. In: Clostridial Diseases of Animals, F. Uzal et al., Editors, J. Wiley & Sons, Inc., 303-330.
- [3] Souillard R, Woudstra C, Le Maréchal C, Dia M, Bayon-Auboyer MH, Chemaly M, Fach P, Le Bouquin S (2014): Investigation of *Clostridium botulinum* in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013. Avian Pathol, 43: 458-464.
- [4] Dlabola J, Hashish E, Pauly B, Kubisiak B, Behm I, Heseler R, Schliephake A, Wieler LH, Neubauer H, Seyboldt C (2016): *Clostridium botulinum* type D/C intoxication in a dairy cow stock in Saxony-Anhalt (Germany) – report on an innovative diagnostic approach. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 129: 111-117.
- [5] Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, Cuervo P, Cheng LW, Derman Y, Dorner BG, Fisher A, Hill KK, Kalb SR, Korkeala H, Lindstrom M, Lista F, Luquez C, Mazuet C, Pirazzini M, Popoff MR, Rossetto O, Rummel A, Sesardic D, Singh BR, Stringer SC (2017): Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. Toxins (Basel), 9: E38.
- [6] Dorner, MB, Schulz KM, Kull S, Dorner BG (2013): Complexity of botulinum neurotoxins: challenges for detection technology. Curr Top Microbiol Immunol, 364: 219-255.
- [7] Dorner BG (2014): „Chronischer Botulismus“: Als neue Krankheit nicht belegt. Dtsch Arztebl International, 111: A1468-A1470, A4.
- [8] Zeleny R, Rummel A, Jansson D, Dorner BG (2019): Challenges in the Development of Reference Materials for Protein Toxins. In: Applications in Forensic Proteomics: Protein Identification and Profiling, E. Merkley, Editor, American Chemical Society, Washington DC, USA.
- [9] Pauly, D, Dorner M, Zhang X, Hlinak A, Dorner B, Schade R (2009): Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. Poult Sci, 88: 281-290.
- [10] Pauly D, Kirchner S, Stoermann B, Schreiber T, Kaulfuss S, Schade R, Zbinden R, Avondet MA, Dorner MB, Dorner BG (2009): Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay. Analyst, 134: 2028-2039.
- [11] Simon S, Fiebig U, Liu Y, Tierney R, Dano J, Worbs S, Endermann T, Nevers M-C, Volland H, Sesardic D, Dorner MB (2015): Recommended immunological strategies to screen for botulinum neurotoxin-containing samples. Toxins (Basel), 7: 5011-5034.
- [12] Hansbauer E-M, Skiba M, Endermann T, Weisemann J, Stern D, Dorner MB, Finkenwirth F, Wolf J, Luginbühl W, Messelhäuser U, Bellanger L, Woudstra C, Rummel A, Fach P, Dorner BG (2016): Detection, differentiation, and identification of botulinum neurotoxin serotypes C, CD, D, and DC by highly specific immunoassays and mass spectrometry. Analyst, 141: 5281-5297.
- [13] Kirchner, S, Krämer KM, Schulze M, Pauly D, Jacob D, Gessler F, Nitsche A, Dorner BG, Dorner MB (2010): Pentaplexed quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. Appl Environ Microbiol, 76: 4387-4395.

- [14] von Berg, L, Stern D, Pauly D, Mahrhold S, Weisemann J, Jentsch L, Hansbauer EM, Müller C, Avondet MA, Rummel A, Dorner MB, Dorner BG (2019): Functional detection of botulinum neurotoxin serotypes A to F by monoclonal neoepitope-specific antibodies and suspension array technology. *Sci Rep*, 9: 5531.
- [15] Kull, S, Pauly D, Störmann B, Kirchner S, Stämmler M, Dorner MB, Lasch P, Naumann D, Dorner BG (2010): Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 82: 2916-2924.
- [16] Le Maréchal, C, Anniballi F, Bano L, Tevell Åberg A, Lindström M, Dorner MB, Hedeland M, Seyboldt C, Koene M, Bilei S, Derman Y, Chemaly M (2020): Workshop on the risks associated with animal botulism and ANIBOTNET final meeting. *Euroreference*, 12: 33-41.
- [17] Mad'arova L, Dorner BG, Schaade L, Donath V, Avdicova M, Fatkulinova M, Strharsky J, Sedliacikova I, Klement C, Dorner MB (2017): Reoccurrence of botulinum neurotoxin subtype A3 inducing food-borne botulism, Slovakia, 2015. *Euro Surveill*, 22: 30591.
- [18] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2016): Type E botulism associated with fish product consumption – Germany and Spain. *EFSA Supporting Publications*, 13: 1157E-n/a, doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1157
- [19] Stern D, von Berg L, Skiba M, Dorner MB, Dorner BG (2018): Replacing the mouse bioassay for diagnostics and potency testing of botulinum neurotoxins – progress and challenges. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 131: 375-394.
- [20] Weisemann J, Krez N, Fiebig U, Worbs S, Skiba M, Endermann T, Dorner MB, Bergström T, Muñoz A, Zegers I, Müller C, Jenkinson S, Avondet M-A, Delbrassinne L, Denayer S, Zeleny R, Schimmel H, Åstot C, Dorner BG, Rummel A (2015): Generation and characterization of six recombinant botulinum neurotoxins as reference material to serve in an international proficiency test. *Toxins (Basel)*, 7: 5035-5054.
- [21] Worbs S, Fiebig U, Zeleny R, Schimmel H, Rummel A, Luginbühl W, Dorner BG (2015): Qualitative and quantitative detection of botulinum neurotoxins from complex matrices: Results of the first international proficiency test. *Toxins (Basel)*, 7: 4935-4966.
- [22] Kull S, Schulz KM, Strotmeier JW, Kirchner S, Schreiber T, Bollenbach A, Dabrowski PW, Nitsche A, Kalb SR, Dorner MB, Barr JR, Rummel A, Dorner BG (2015): Isolation and functional characterization of the novel *Clostridium botulinum* neurotoxin A8 subtype. *PLoS One*, 10: e0116381.
- [23] Lee K, Zhong X, Gu S, Kruegel AM, Dorner MB, Perry K, Rummel A, Dong M, Jin R (2014): Molecular basis for disruption of E-cadherin adhesion by botulinum neurotoxin A complex. *Science*, 344: 1405-1410.
- [24] Stern D, Weisemann J, Le Blanc A, von Berg L, Mahrhold S, Piesker J, Laue M, Luppä PB, Dorner MB, Dorner BG, Rummel A (2018): A lipid-binding loop of botulinum neurotoxin serotypes B, DC and G is an essential feature to confer their exquisite potency. *PLoS Pathog*, 14: e1007048.
- [25] Yao G, Zhang S, Mahrhold S, Lam K-H, Stern D, Bagramyan K, Perry K, Kalkum M, Rummel A, Dong M, Jin R (2016): N-linked glycosylation of SV2 is required for binding and uptake of botulinum neurotoxin A. *Nat Struct Mol Biol*, 23: 656-662.