
Botulismo

RESUMEN

El botulismo es una afección neuroparalítica causada por la ingestión de toxinas producidas por *Clostridium botulinum*, una bacteria gram positiva que forma esporas anaeróbicas, que se encuentra extensamente distribuida en la naturaleza, el suelo y los sedimentos de lagos y mares. Se han descrito siete neurotoxinas (A a G); la C es la más comúnmente hallada en los animales pequeños. En perros, la enfermedad ocurre principalmente por ingestión de toxina preformada presente en alimentos deteriorados o carcasas en putrefacción. La neurotoxina tipo C causa bloqueo de los receptores de acetilcolina en la unión neuromuscular, generalmente horas a días después de la ingestión. Los perros afectados tienen una parálisis flácida ascendente de los músculos esqueléticos, aunque la sensibilidad y la conciencia están preservadas. El diagnóstico inicial se lleva a cabo por la historia del animal, y por las manifestaciones clínicas. La técnica de diagnóstico estándar para el diagnóstico definitivo es la inoculación intraperitoneal en ratones de suero sanguíneo de los animales con sospecha de enfermedad. Los cuidados de soporte son esenciales para la recuperación. El pronóstico es bueno si no se desarrollan infecciones secundarias u otras complicaciones. La recuperación se completa luego de un período de 2 a 3 semanas. En los casos más severos puede ocurrir la muerte por parálisis de los músculos respiratorios. La prevención de la enfermedad en los perros se basa en la restricción del consumo de alimentos deteriorados o carcasas en putrefacción.

PALABRAS CLAVE: botulismo, *Clostridium botulinum*, neurotoxina, parálisis flácida, perros

Esta obra se publica bajo licencia Creative Commons-Reconocimiento-No comercial-4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.es_ES

Botulism

ABSTRACT

Botulism is a neuroparalytic affection caused by ingestion of toxins produced by *Clostridium botulinum*, a gram positive bacterium, anaerobic spore-forming, which are widely distributed in nature, soil and sediments of lakes and seas. It has been described seven neurotoxins (A to G); the C most commonly found in small animals. In dogs, the disease mainly occurs by ingestion of preformed toxin present in spoiled food or rotting carcasses. The neurotoxin type C cause blockage of acetylcholine receptors at neuromuscular junction, generally from hours to days after ingestion. The affected dogs have ascending flaccid paralysis of the skeletal muscles, although the sensitivity and awareness are maintained. Initial diagnosis is carried out through the history of the animal as well as clinical manifestations. The standard technique for definitive diagnosis is intraperitoneal inoculation of blood serum of suspected animals in mice. Supportive care is essential to recovery. The prognosis is good if there is no development of secondary infections or other complications. The recovery is complete after a period of 2 to 3 weeks. In more severe cases, death can occur due to paralysis of the respiratory muscles. The prevention of the disease in dogs is based on restricting the consumption of spoiled food or rotting carcasses.

Key words: botulism, *Clotridium botulinum*, neurotoxin, flaccid paralysis, dogs.

Fecha de recepción de originales: 20-07-2017

Fecha de aceptación para publicación: 30-09-19

Definición

El botulismo es una enfermedad neuroparalítica aguda, grave y no contagiosa, que ocurre por bloqueo de la liberación de acetilcolina desde las vesículas sinápticas debido a la acción específica de neurotoxinas botulínicas⁴⁴⁻⁴⁶. Los individuos afectados presentan una parálisis flácida de la musculatura esquelética,

generalmente ascendente y de evolución rápida^{87,94,95}. Se observa principalmente en equinos, rumiantes y aves domésticas; en los perros y otros carnívoros es menos frecuente^{13,33,53,73,88,99}. En los animales domésticos el botulismo fue reconocido hace aproximadamente 50 años⁸.

Prevalencia

Se desconoce la verdadera prevalencia de la enfermedad^{26,69,72}. Los animales afectados por botulismo suelen ser callejeros y/o tener acceso a basurales y/ o cadáveres. En áreas endémicas para botulismo, las carcasas de animales muertos son invadidas por *C.botulinum* con la subsecuente producción de elevadas concentraciones de toxinas, de modo que pequeñas cantidades de carne o huesos contienen la neurotoxina en concentraciones letales. La toxina puede persistir en la carroña de los animales de producción por un mínimo de 1 año⁵. En zonas de clima templado, el botulismo se presenta casi exclusivamente durante los meses de verano; temperaturas comprendidas entre 22^o y 37^oC en estas regiones favorecen la producción de toxinas por la bacteria en el alimento⁸. Aún en los países que presentan condiciones favorables para su desarrollo, la mayoría de las descripciones de botulismo en perros y gatos quedan restringidas a comunicaciones de casos⁷².

Etiología

La enfermedad puede ser causada por las neurotoxinas producidas por *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* y *Clostridium butyricum*⁸⁵. *C. botulinum* produce 7 serotipos conocidos (A a G), mientras que *C. baratii* y *C. butyricum* produce un serotipo cada uno (F y E, respectivamente)^{51,90}.

En los humanos, el botulismo es causado por los serotipos A, B, E y, raramente, el F^{9,38,92}. En los animales, el botulismo es causado principalmente por los serotipos B, C y D¹⁸. La toxina G fue asociada a algunos casos de muerte súbita, en tanto que los tipos C y D se han identificado exclusivamente en animales^{14,32,55,92,93}. El tipo D es más prevalente en herbívoros y el C predomina en aves y carnívoros⁸⁷.

Los serotipos/cepas de *C.botulinum* que forman esporas anaeróbicas han sido subclasificados en los grupos I-IV en base a su metabolismo y patogénesis. Los grupos I (cepas proteolíticas que producen las toxinas A, B y F) y II (cepas no proteolíticas que producen las toxinas B, E y F) incluyen las cepas patógenas humanas⁹¹. Las cepas del grupo III producen toxinas C o D y están asociadas con el botulismo en los animales, y el grupo IV incluye solamente cepas que producen neurotoxinas G^{19,60}.

Las toxinas botulínicas son consideradas las más potentes, presentando una DL50 de 1 a 5 ng/kg⁶⁶. Las esporas de *C.botulinum* son las formas más resistentes dentro de los agentes bacterianos, pudiendo sobrevivir por más de 30 años en medio líquido y, probablemente, más tiempo en estado seco¹⁵.

Para la germinación de las esporas y la división celular se requieren condiciones anaeróbicas y un ambiente con nutrientes apropiados (altas cantidades de material orgánico)⁷. Al contrario de las esporas, las toxinas son termolábiles^{52,92,93}. Para destruirlas, los alimentos contaminados deben ser hervidos a 120°C por 30 minutos³².

Fisiopatología

Las neurotoxinas botulínicas (de su sigla en inglés, BoNT) son metaloproteinasas polipeptídicas de 150 kDa^{5,82}. La toxina es sintetizada por *C.botulinum* como una proteína de cadena sencilla, para ser exportada fuera de la bacteria por un mecanismo aún no bien conocido; luego es escindida proteolíticamente por proteasas tisulares en una cadena pesada y en una cadena liviana que permanecen unidos por un puente disulfuro. Esta molécula bicatenaria constituye la neurotoxina activa⁶³. En un medio de cultivo o en la comida, la toxina se encuentra asociada en forma no covalente a proteínas no tóxicas, incluyendo subunidades de aglutinina y un componente único no tóxico no-hemaglutinina para formar complejos botulínicos de varios tamaños²¹.

Existen 3 formas clínicas clásicas de adquisición de botulismo, que incluyen: a) la producida por ingestión de alimentos; b) la colonización intestinal infantil y adulta; y c) la que se produce por heridas infectadas^{98,103}, aunque también se ha descrito una forma iatrogénica⁶ y otra por inhalación^{4,16}.

El botulismo por ingestión de alimentos es causada habitualmente por ingestión de toxinas de *C.botulinum* y otras especies

relacionadas⁹⁴; una pequeña cantidad de neurotoxina (aproximadamente 30 ng) puede llegar a ser fatal⁷⁴. La vía de contaminación más frecuente es el consumo de alimentos (carne en descomposición, carcasas, conservas en mal estado) o pastos contaminados con la neurotoxina ya producida; es la principal fuente de intoxicación en los animales domésticos^{68,70}. La tasa de mortalidad general es de 5-10%⁶⁹, y puede llegar hasta el 80% en los rumiantes⁷³.

El botulismo por colonización intestinal se produce por la ingestión de esporas, seguida por la germinación y producción intraluminal de neurotoxina, que posteriormente es absorbida. En los humanos afecta principalmente a chicos de menos de 1 año de edad, y más raramente a los adultos. Habitualmente ocurre cuando la microbiota intestinal normal ha sido suprimida (por ejemplo, por terapia antibiótica)^{3,36}.

El botulismo por heridas es una infección muy infrecuente, en la que el crecimiento bacteriano y la formación de neurotoxina ocurre a partir de una herida producida en el cuerpo^{98,103}.

El botulismo por inhalación no ocurre naturalmente en forma espontánea. Se produce por diseminación deliberada de toxina botulínica mediante aerosoles⁴.

El botulismo iatrogénico es causado por inyección de toxina botulínica con propósitos cosméticos o terapéuticos a dosis mayores que las indicadas⁶.

Cuando es ingerida, la neurotoxina se absorbe fundamentalmente en la parte más craneal del intestino delgado^{10,94}, y alcanza los nervios colinérgicos a través de la circulación sanguínea y linfática⁶¹. También puede absorberse por el estómago⁶¹ o atravesar otras células epiteliales como la mucosa respiratoria, lo que explica la posible contaminación por inhalación⁷¹.

La inducción de la parálisis neuromuscular mediada por la neurotoxina requiere 3 pasos bioquímicos. Primero, la cadena pesada de la BoNT se une a los receptores específicos de alta afinidad de la membrana celular de las terminales nerviosas colinérgicas somáticas y autonómicas en la unión neuromuscular⁸². En el caso de toxina A y B parecen requerirse al menos 2 receptores, gangliósidos de la serie GT1b y GD1b (diferentes para cada tipo de toxina), y la proteína de vesícula sináptica SV2⁶⁷. Una vez unido a este receptor, ambas cadenas de la BoNT se internalizan mediante endocitosis mediada por receptor⁹ dentro del compartimento vesicular de la neurona, a través de varios

mecanismos posibles, que involucran a sinaptotagminas I y II, y SV2³¹ y una bomba de protones dependiente de ATP^{66,82}. El compartimento vesicular es ácido, e induce un cambio conformacional dependiente del pH que facilita la translocación de la cadena ligera a través de la membrana hidrofóbica hacia el citosol, donde se encuentran los sustratos de la BoNT. Una vez en el citosol, la cadena ligera de la toxina ejercerá su actividad de metaloproteasa sobre algunas dianas intracelulares que regulan la exocitosis, inhibiendo la liberación de acetilcolina. Los diferentes tipos de BoNT pueden unirse a varias proteínas dentro del sistema de neuroexocitosis en la membrana. Dichas dianas forman parte del complejo receptor de proteínas de fusión del factor soluble sensible a N-etilmaleimida (de su sigla en inglés, SNARE), e incluye sinaptobrevina (proteína asociada a la membrana de las vesículas sinápticas), syntaxina y SNAP-25 (proteína asociada al sinaptosoma de peso molecular de 25 kDA); las 2 últimas proteínas están asociadas a la membrana sináptica⁶⁷. Las proteínas SNARE son esenciales para la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica, eventos fundamentales en la exocitosis de acetilcolina^{7,24}. El bloqueo de la liberación de neurotransmisor se produce por la escisión dependiente de zinc de 1 o 2 de los 3 componentes del núcleo del aparato de exocitosis^{24,50,90,93}. La proteína del complejo SNARE afectada dependerá del tipo de BoNT; las neurotoxinas tipo B, D, F y G afectan la sinaptobrevina, los tipos A y E afectan SNAP-25, y finalmente la tipo C actúa tanto en syntaxina como en SNAP-25^{50,80,81}.

La acción de la toxina C no altera la formación de vesículas sinápticas, ni su número ni su distribución a lo largo de la membrana presináptica. La liberación de neurotransmisor en la unión neuromuscular simplemente no ocurre, porque está inhibido el proceso de exocitosis⁵. Al inhibir la liberación de acetilcolina de las vesículas sinápticas, la BoNT reduce la contracción muscular, la secreción glandular y la señal aferente. El resultado funcional es una denervación muscular o glandular, conocido como quimiodenervación^{30,67}. Este proceso es reversible mediante la reinstauración de la actividad vesicular en las terminales nerviosas originales (reinervación), asunto que puede tardar entre 3 y 6 meses^{27,67}. Si el individuo afectado logra sobrevivir, la recuperación ocurre por inactivación de las cadenas livianas, remoción de las proteínas truncadas y síntesis de nuevas SNARE, con recuperación de los componentes funcionales de la unión

neuromuscular. De este modo, los animales con botulismo tienen un pronóstico reservado a favorable, con potencial para una recuperación completa de la función neurológica, sin secuelas⁷.

Manifestaciones clínicas

Todos los signos neurológicos provocados por las BoNTs están relacionados al sistema nervioso periférico ya que, por su elevado peso molecular, no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica⁴⁹.

El botulismo se caracteriza por la disfunción generalizada de la neurona motora inferior, llevando a parálisis flácida y debilidad. Se considera una enfermedad rara en los perros⁷. En la especie felina, el botulismo ha sido comunicado en leones⁴³, pero los gatos domésticos son particularmente resistentes a la BoNT⁸⁹, y los trastornos neuromusculares solamente se han descrito en forma experimental⁶⁴. Si la enfermedad clínica ocurriera, los signos son similares a las otras especies²², incluyendo depresión moderada, recumbencia, anorexia, disnea y parálisis flácida que evoluciona a tetraplejía³³.

El período de incubación en los perros varía de 24 a 48 horas, pudiendo prolongarse hasta 6 días después de la ingesta de la toxina²⁰. La severidad de los signos clínicos está directamente relacionada a la susceptibilidad individual y a la cantidad de toxina ingerida. En general, cuanto más precoces son los signos clínicos mayor es su gravedad. Los perros afectados presentan una astenia simétrica ascendente progresiva que puede terminar en tetraplejía^{7,42}. El tono muscular se encuentra reducido y los reflejos espinales están ausentes, aunque los movimientos de la cola están típicamente preservados, lo que indica que no hay compromiso de los tractos motores de la médula⁹⁶. Ocasionalmente se observan alteraciones de los nervios craneanos, como pérdida del reflejo pupilar, alteraciones del ladrido, paresia facial, disminución del tono mandibular, disfagia y megesófago^{7,96}. Es habitual la regurgitación secundaria al megesófago⁹⁶. Pueden aparecer signos autonómicos parasimpáticos como disminución de la producción de saliva (con la consecuente queratoconjuntivis seca) y lágrimas, midriasis, constipación y retención urinaria⁴⁹.

La recuperación, si ocurre, tiene una duración variable de 14 a 24 días⁷. En los casos más severos la muerte ocurre por parálisis respiratoria debido al compromiso de los músculos

intercostales y/o el diafragma^{7,42,96}, o debido a infecciones secundarias, generalmente en el tracto respiratorio y urinario⁷. En los casos menos graves la neumonía por aspiración puede ocurrir como complicación del megaesófago y la disfagia⁴⁹.

Diagnóstico

El diagnóstico de rutina se basa en las manifestaciones clínicas y en la anamnesis, que generalmente incluye ingestión de alimentos deteriorados o carcasas descompuestas⁹⁶. Los exámenes de laboratorio se encuentran dentro de los valores de referencia^{7,42}, a menos que ocurran complicaciones tales como úlcera por decúbito e infecciones del tracto respiratorio o urinario⁷. Las únicas anormalidades que se han comunicado consisten en hiperglucemia y neutrofilia sin otros cambios bioquímicos o hematológicos¹⁷.

Las radiografías torácicas pueden revelar megaesófago o neumonía por aspiración⁹⁷. La EMG demuestra que la alteración de la motoneurona superior se encuentra en la unión neuromuscular⁴². A medida que la enfermedad va evolucionando se puede observar actividad insercional prolongada, potenciales de fibrilación, potenciales evocados de acción muscular de baja amplitud y disminución de la velocidad de conducción nerviosa motora y sensitiva de los nervios periféricos. La restauración de estos parámetros electrofisiológicos se correlaciona con la mejoría clínica¹⁰⁰.

La biopsia del nervio o del músculo se puede realizar para establecer el diagnóstico diferencial de trastornos no infecciosos⁸⁴. Las alteraciones histopatológicas que se han descrito en humanos consisten en degeneración miofibrilar con cambios basofílicos y atrofia angular difusa, sin compromiso significativo de los nervios periféricos²⁸. Se han comunicado también cambios inflamatorios desmielinizantes en los nervios craneanos³⁹.

El aislamiento de *C.botulinum* a partir de las heces o el contenido intestinal debe ser evaluado con cautela, ya que las esporas pueden encontrarse normalmente en el tracto gastrointestinal de animales sanos⁵⁸. Además, el aislamiento del organismo demora mucho tiempo, requiere instalaciones especializadas y personal entrenado. En este sentido, el *C.botulinum* productor de toxina C es considerado como uno de los más difíciles, porque exige estrictas condiciones de anaerobiosis⁷. En la necropsia no

se evidencian lesiones consideradas como características. Las alteraciones patológicas pueden ser atribuidas a la acción paralizante de la toxina, principalmente en la musculatura respiratoria. No hay un efecto clásico de la toxina en algún órgano en particular²⁹.

El diagnóstico definitivo de botulismo se basa en la demostración de la toxina en el suero, en las heces, el vómito o el contenido gástrico, o en muestras de alimento ingerido. El suero debe ser recolectado lo más precozmente posible desde el inicio de la enfermedad y, de preferencia, cuando el animal presenta signos clínicos evidentes⁷. El método estándar más confiable para la identificación de la toxina sigue siendo el bioensayo de inoculación en ratones^{35,37,87}. La prueba consiste en inocular 0.5 ml de suero sanguíneo del animal con sospecha clínica de botulismo en la cavidad peritoneal del ratón, manteniendo un grupo control sin inocular. Los animales se observan en intervalos de 3 o 4 horas durante 72 horas para verificar las posibles alteraciones en el comportamiento y el estado físico. La presencia de toxina activa en la muestra se estima si, después de la inoculación, los ratones muestran pelo erizado, disnea, relajación muscular característica en la región abdominal ("cintura de avispa"), dificultades en la locomoción y muerte, sin presencia de signos en el grupo control⁶⁵. Esta prueba es extremadamente sensible, con un límite de detección de 10-20 pg de toxina/mL. Como desventajas, hay que utilizar animales de laboratorio y exige la utilización de pruebas de neutralización para la determinación del serotipo de toxina⁶². Existen otras pruebas alternativas que tienen similar sensibilidad y confiabilidad¹⁰⁴, como las técnicas de radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, hemaglutinación pasiva y ELISA^{12,20,75,76}. También se han desarrollado varias metodologías de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para optimizar el diagnóstico sin utilizar animales de laboratorio^{25,40,48,77}.

El advenimiento de las toxinas proteómicas en el diagnóstico molecular del botulismo marca el inicio del fin de las limitaciones asociadas a la identificación de las neurotoxinas. Se han desarrollado métodos endopeptidasa basados en la espectrometría de masa que determina la presencia de BoNT en una muestra, y diferencia el tipo de toxina presente^{54,57,102}. Uno de estos métodos, el Endopep-MS, también se ha usado en animales⁴⁷.

Diagnostico diferencial

Los principales diagnósticos diferenciales del botulismo son las polirradiculoneuritis infecciosas, la polirradiculoneuropatía inmunomediada, la parálisis por garrapatas, la miastenia gravis en su forma fulminante, el envenenamiento por mordeduras de serpiente^{1,23,41,83,86} (Ver sección correspondiente a polirradiculoneuropatía inmunomediada).

La rabia también debe ser considerada en el diagnóstico diferencial, especialmente en zonas endémicas y en los perros más severamente afectados; de modo general, la rabia produce alteraciones del estado de conciencia, y la muerte ocurre indefectiblemente en unos 10 días^{7,96}.

Tratamiento

No existe tratamiento específico para botulismo en perros⁹⁶. La terapia de soporte es fundamental, ya que la recuperación espontánea del animal afectado va a ocurrir si la cantidad de toxina ingerida no es alta y si se evitan las complicaciones por el decúbito y las infecciones respiratorias y urinarias^{7,42}.

En los animales que han ingerido recientemente alimento sospechoso, puede ser beneficiosa la remoción de la toxina no absorbida del tracto intestinal mediante lavado gástrico, o el uso de catárticos o enemas⁷. Sin embargo, los agentes catárticos que contienen magnesio pueden potenciar la acción de la toxina botulínica⁸⁷. Determinados agentes terapéuticos como la tetraetilamida y el hidroclorehidrato de guanidina mejoran la liberación de neurotransmisores en la unión neuromuscular, y pueden ser eficaces aplicados por vía endovenosa⁷⁸.

Los animales afectados deben ser mantenidos en un piso confortable, preferentemente acolchado, debido al decúbito prolongado, deben ser cambiados de decúbito varias veces al día y auxiliarlos en su alimentación manteniéndolos en decúbito esternal, o mediante sonda esofágica si la deglución está comprometida⁴². Se debe monitorear la producción urinaria y, si es necesario, la vejiga debe ser evacuada manualmente 3 o 4 veces al día. Si existiera constipación deben aplicarse enemas y laxantes^{7,101}. Se debe evitar la deshidratación, especialmente si la deglución se encuentra comprometida, mediante la administración de fluidos parenterales⁷. El uso de colirios de lágrimas

artificiales o pomadas lubricantes oftálmicas está indicado si el reflejo palpebral está ausente. El soporte mediante fisioterapia, baños de turbulencia o natación asistida, la estimulación del animal para permanecer en estación sosteniendo su cuerpo, y caminatas con cabestrillo colaboran en la recuperación funcional²⁶.

Los antibacterianos deben ser utilizados solamente si son necesarios, cuando se desarrollan infecciones secundarias, para evitar alteraciones de la microbiota intestinal que favorecen la multiplicación de *C.botulinum*. La antibioticoterapia con penicilina (10.000-30.000 UI cada 12 horas) o metronidazol (5 mg/kg cada 3 horas) se ha utilizado en una tentativa de reducir la microbiota intestinal de clostridios patogénicos^{7,42}. La eficacia de estos fármacos es controvertida, ya que la enfermedad generalmente es provocada por la ingesta de la exotoxina preformada, y porque ningún fármaco es capaz de eliminar al *C.botulinum* del intestino. Además, estos fármacos podrían agravar el cuadro clínico por la liberación de más toxinas debido a la lisis del *C.botulinum*, o promoviendo el desarrollo de infección intestinal⁷.

Para el tratamiento específico, la antitoxina tipo C puede administrarse por vía intramuscular en 2 aplicaciones con intervalo de 4 horas, en una dosis de 10.000 U⁹⁶. Se recomienda aplicar previamente 0.1 mL del suero vía subcutánea para evaluar reacciones de hipersensibilidad. Su uso es controversial⁴², ya que es eficaz solamente si se administra al inicio de la enfermedad, porque no actúa sobre la toxina ligada a las terminaciones nerviosas, unión que ocurre rápidamente después de su absorción⁷. Ningún fármaco que antagonice los efectos de las toxinas botulínicas está disponible comercialmente ni para humanos ni para animales⁵.

El pronóstico es bueno en aquellos animales con compromiso leve a moderado, en los que la recuperación ocurre en 2 o 3 semanas. En los casos más graves el pronóstico es reservado, y la muerte ocurre por parálisis de los músculos respiratorios o debido a las infecciones secundarias, principalmente pulmonares y de las vías urinarias^{7,11,34}.

La prevención del botulismo en los perros puede ser realizada restringiendo el acceso a carne podrida, impidiendo el consumo de carne cruda de aves y alimentos contaminados o cocinados en forma inadecuada⁵⁶. La cocción de los alimentos a

80°C por 30 minutos o a 100°C por 10 minutos inactiva la toxina botulínica⁷.

Las vacunas con toxoides botulínicos son utilizadas en otras especies como forma de prevención, principalmente en rumiantes y aves silvestres^{2,59,79}. Mientras tanto, en el caso de los perros, la vacunación no se justifica, ya que los casos son esporádicos⁷. Los animales recuperados no desarrollan inmunidad debido a las pequeñas cantidades de toxina necesarias para producir signos clínicos¹⁸.

Bibliografía

1. Añor S. 2014 Acute lower motor neuron tetraparesis. [Vet Clin North Am Small Anim Pract](#).44:1201-22.
2. Arimitsu H, Lee JC, Sakaguchi Y, Hayakawa Y, Hayashi M, Nakaura Miki, et al. 2004. Vaccination with recombinant whole heavy chain fragments of Clostridium botulinum Type C and D neurotoxins. *Clin Diagn Lab Immunol*;11:496-502.
3. Arnon SS. 1995. Botulism as an intestinal toxemia. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL (eds.). *Infection of the Gastrointestinal Tract*. Raven, New York; pp:257-271.
4. Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Swerdlow, Tonat K.2001. Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon: Medical and public health management. *J Am Med Assoc*. 285:1059-1070.
5. Atassi MZ, Oshima M. 1999. Structure, activity, and immune (T and B cell) recognition of botulinum neurotoxins. *Crit Rev Immunol*. 19:219-60.
6. Bakheit AM, Ward CD, McLellan DL. 1997. Generalized botulism-like syndrome after intramuscular injections of botulinum toxin type A: A report of two cases. *J Neurol Neurosurgl Psych*, 62:198.
7. Barsanti JA.2012. Botulism. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp:416-22.
8. Beer J.1999. Doenças infecciosas em animais domésticos. 2ª ed. São Paulo: Roca, pp:255-60.
9. Bleck TP. 1995. Clostridium botulinum. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds.). *Principles and practice of infectious diseases*. New York: Churchill Livingstone, pp:218-81.

-
10. Bonventre PF. 1979. Absorption of botulinum toxin from the gastrointestinal tract. *Rev Infect Dis*, 1:663-667.
 11. Bors M, Valentine BA, Lahunta A. 1988. Neuromuscular disease in a dog. *Cornell Vet*, 78:339-45.
 12. Brett MM. 1998. Evaluation of the use of the bioMerieux rapid ID32 A kit for the identification of *Clostridium botulinum*. *Letters in Microbiology*, 26:81-84.
 13. Bruchim Y, Steinman A, Markovitz M, Baneth G, Elad D, Shpigel NY2006. Toxicological, bacteriological and serological diagnosis of botulism in a dog. *Vet Re*, 158:768-769.
 14. Cardoso T, Costa M, Almeida HC, Guimaraes M. 2004. Botulismo alimentar: estudo retrospectivo de cinco casos. *Acta Med Port*, 17:54-8.
 15. Cereser ND, Costa FMR, Rossi Júnior OD, Silva DAR, Sperotto VR.2008. Botulismo de origem alimentar. *Cienc Rural*, 38:280-7.
 16. Coban A, Matur Z, Hanagasi HA, Parman Y.2010. Iatrogenic botulism after botulinum toxin type A injections. *Clin Neuropharmacol*, 33:158-160.
 17. Cobb SP, Hogg RA, Challoner DJ, Brett MM, Livesey CT, Sharpe T, Jones TO.2002. Suspected botulism in dairy cows and its implications for the safety of human food. *Vet Rec*, 150, 5-8.
 18. Coleman ES. 1998. Clostridial neurotoxins: tetanus and botulism. *Comp Cont Ed Pract Vet*, 20:1089-1097.
 19. Collins MD, East AK. 1998. Phylogeny and taxonomy of the food borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *J Appl Microbiol*, 84:5- 17.
 20. Corrêa WM, Corrêa CNM.1992. Clostridioses. In: *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2a ed. Rio de Janeiro: MEDSI, pp:291-315.
 21. Couesnon A, Pereira Y, Popoff MR. 2008. Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. *Cellular Microbiol*, 10:375-387.
 22. Critchley EMR. 1991. Acomparison of human and animal botulism: a review. *JRSoc Med*, 84:295-298.
 23. Cuddon PA. 2002. Acquired canine peripheral neuropathies. *Vet Clinics North Am Small Anim Pract*, 32:207-49.

-
24. Chaddock JA, Melling J. 2001. Clostridium botulinum and associated neurotoxins. In: Sussman M. Molecular medical microbiology. San Diego: Academic Press, p.1141-52.
 25. Chaffer M, Baum M, Grinberg K, Molad T, Elad D. 2006. Application of PCR for detection of Clostridium botulinum type D in bovine samples. J Vet Med, 53:45-47.
 26. da Silveira E, Marques SMT. 2016. Botulismo canino: Revisão. PubVet , 10(10):1-5.
 27. De Pavia A, Meunier FA, Molgo J, Aoki KR, Dolly JO. 1999. Functional repair of motor endplates alter botulinum neurotoxin type A poisoning: Biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. Proc Natl Acad Sci US, 96:3200-3205.
 28. Devers KG, Nine JS. 2010. Autopsy findings in botulinum toxin poisoning. Journal of Forensic Science, 55:1649-1651.
 29. Dohms JE. 2010. Clostridial diseases : Botulism. In: Kahn CM, Lines S, Aiello SE (eds.). The Merck Veterinary Manual. 10th ed. Whitehouse Station: Merck and Co, Inc., pp:552-3.
 30. Dolly O. 2003. Synaptic Transmission: Inhibition of Neurotransmitter release by botulinum toxins. Headache, 43:S16- S24.
 31. Dong M, Richards DA, Goodnough MC, Tepp WH, Johnson EA, Chapman ER. 2003. Synaptotagmin I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. J Cell Biol, 162:1293-1303.
 32. Eduardo MBP, Mello MLD, Katsuya EM, Campos JC. 2002. Manual de Botulismo: orientações para profissionais de saúde. São Paulo.
 33. Elad D, Aroch EY-N, Shami MH, Kleinbart S, Hadash D, Chaffer M, Greenberg K, Shlosberg A. 2004. Natural Clostridium botulinum type C toxicosis in a group of cats. J Clin Microbiol, 42:5406-5408.
 34. Farrow BR, Murrell WG, Revington ML, Stewart BJ, Zuber RM. 1983. Type C botulism in young dogs. Aust Vet J, 60:374-7.
 35. Fénicia L, Franciosa G, Pourshaban M, Aureli P. 1999. Intestinal toxemia in two young people, caused by Clostridium butyricum type E. Clin Infect Dis , 29:1381-7.
 36. Fénicia L, Anniballi F, Aureli P. 2007. Intestinal toxemia botulism in Italy, 1984– 2005. Europ J Clin Microbiol Infect Dis , 26:385-394.
 37. Fernandez RA, Ciccarelli AS. 1999. Botulism: laboratory methods and epidemiology. Anaerobe, 5:165-8.

-
38. Ferrari ND, Weisse ME. 1995. Botulism. *Adv Pediatr Infect Dis.*, 10:81-91.
 39. Filozov A, Kattan JA, Jitendranath L, Smith CG, Lúquez C, Phan QN, Fagan RP. 2012. Asymmetric type F botulism with cranial nerve demyelination. *Emerging Infectious Diseases*, 18:102-104.
 40. Franciosa G, Fenicia L, Caldiani C, Aureli P. 1996. PCR for detection of *Clostridium botulinum* type C in avian and environmental samples. *J Clin Microbiol*, 34:882-885.
 41. Gerritsen RJ, van Nes JJ, van Niel MH, van den Ingh TS, Wijnberg ID. 1996. Acute idiopathic polyneuropathy in nine cats. *Vet Q*, 18:63-5.
 42. Greene CE. 1997. Moléstias bacterianas. In: Ettinger SJ, Feldman EC (eds.). *Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato*. 4a ed. São Paulo: Manole.
 43. Greenwood AG. 1985. Diagnosis and treatment of botulism in lions. *Vet Rec*, 117:58-60.
 44. Hatheway CL. 1995. Botulism: The present status of the disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 195:55-77.
 45. Hatheway CL, Johnson EA. 1998. Clostridium: the spore-bearing anaerobes. In: Balows A, Duerden BI (eds.). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, Vol. 2, 9th ed. Arnold, London, pp:731-782.
 46. Hatheway CL. 1998. Clostridium botulinum. In: *Infectious Diseases*, 2nd ed., In: Gorbach SL (ed.). WB Saunders Co, Philadelphia, pp:1919-1925.
 47. Hedeland M, Moura H, Båverud V, Woolfitt AR, Bondesson U, Barr JR. 2011. Confirmation of botulism in birds and cattle by the mouse bioassay and Endopep-MS. *J Med Microbiol*, 60:1299-1305.
 48. Hill BJ, Skerry JC, Smith TJ, Arnon SS, Douek DC. 2010. Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes. *BMC Microbiology*, 10:267. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/267>.
 49. Horowitz B Z. 2005. Botulinum toxin. *Crit Care Clin.*, 21:825-39.
 50. Humeau Y, Doussau F, Grant NJ. 2000. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie*, 82:427-46.
 51. Hutson RA, Thompson DE, Lawson PA, Schocken-Itturino RP, Bottger EC, Collins MD. 1993. Genetic interrelationships of proteolytic Clostridium botulinum types A, B, and F and other members of the Clostridium botulinum complex as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 64:273-283.

-
52. Hutzler RU. 2005. Botulismo. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp:1563-6.
 53. Johnson A L, McAdams SC, Whitlock RH. 2010. Type A botulism in horses in the United States: A review of the past ten years (1998–2008). *J Vet Diagn Invest*, 22:165-173.
 54. Kalb SR, Santana WI, Geren IN, Garcia-Rodriguez C, Lou J, Smith TJ, Marks JD, Smith LA, Pirkle JL, Barr JR. 2011. Extraction and inhibition of enzymatic activity of botulinum neurotoxins /B1, /B2, /B3, /B4, and /B5 by a panel of monoclonal anti-BoNT/B antibodies. *BMC Biochemistry*, 12:58. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/12/58>.
 55. Kalluri P, Crowe C, Reller M, Gaul L, Hayslett J, Barth S, et al. 2003. An outbreak of foodborne Botulism Associated with Food Sold at a Salvage Store in Texas. *Clin Infect Dis.*, 37:1490-5.
 56. Kriek NPJ, Odendaal MW. Botulism. In: Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin RC (eds.). 1994. Infectious diseases of livestock. Cape Town: Oxford Press, pp:1354-71.
 57. Lévêque C, Ferracci G, Maulet Y, Grand-Masson C, Blanchard M, Seagar M, El-Far O. 2013. A substrate sensor chip to assay the enzymatic activity of Botulinum neurotoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 9:276-281.
 58. Lindström M, Korkeala H. 2006. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev*, 19:298-314.
 59. Lobato FCF, Salvarani FM, Silva ROS, Souza AM, Lima CGRD, Pires PS, et al. 2008. Botulismo em ruminantes causado pela ingestão de cama de frango. *Cienc Rural*, 38:1176-8.
 60. Lund BM, Peck MW. 2000. Clostridium botulinum. In: Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW (eds.). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD, pp:1057–1109.
 61. Maksymowych AB, Reinhard M, Malizio CJ, Goodnough MC, Johnson EA, Simpson LL. 1999. Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade. *Infection and Immunity*, 67:4708-4712.
 62. Mcgrath S, Dooley JSG, Haylock RW. 2000. Quantification of Clostridium botulinum toxin gene expression by competitive reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*, 66:1423-8.
 63. Midura TF. 1996. Infant botulism. *Clin Microbiol Rev*, 2:119-25.

-
64. Mikhailov VV. 1958. Electrophysiological analysis of disturbances in reflex activity of the spinal cord in experimental botulism type A in warm- and cold-blooded animals. *Bull Exp Biol Med*, 46:1188-92.
 65. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2006. Manual integrado de vigilância epidemiológica de botulismo. Brasília: Editora do Ministério da Saúde.
 66. Montecucco C, Molgo J. 2005. Botulinal neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol*, 5:274-9.
 67. Morales MV, Payares K, Zuluaga A. 2013. Conocimientos básicos sobre la toxina botulínica para una utilización terapéutica segura. *Rev Col Med Fis Rehab*, 23(2): 147-159.
 68. Myllykoski J, Lindström M, Bekema E, Pölönen I, Korkeala H. 2011. Fur animal botulism hazard due to feed. *Res Vet Sc*, 90:412-418.
 69. Nume SM, Useh NM. 2014. Botulism in man and animals. *Bulgarian J Vet Med*, 17(4):241-266.
 70. Ostrowski SVK, Palmero J, Reilly CM, Higgins JK, Cook-Cronin S, Tawde SN, Crossley BM, Yant P, Cazarez R, Uzal FA. 2012. An outbreak of equine botulism type A associated with feeding grass clippings Stephanie R. *J Vet Diagn Invest* 24:601. Doi: 10.1177/1040638712440 987.
 71. Park JB, Simpson LL. 2003. Inhalational poisoning by botulinum toxin and inhalation vaccination with its heavy-chain component. *Infection and Immunity* 71:1147-1154.
 72. Paula CL, Bolaños CD, Ribeiro MG. 2016. Botulismo em cães: Revisão de literatura. *Vet e Zootec*, 23(1):38-48.
 73. Payne JH, Hogg RA, Otter A, Roest HIJ, Livesey CT. 2011. Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2001-2009), associated with exposure to broiler litter. *Vet Rec*, 168:640-643.
 74. Peck MW. 2006. Clostridium botulinum and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *J Appl Microbiol*, 101:556-570.
 75. Piazza TM, Blehert DS, Dunning FM, Berlowski-Zier BM, Zeytin FN, Samuel MD, Tucker WC. 2011. *In vitro* detection and quantification of botulinum neurotoxin type E activity in avian blood. *Applied Environmental Microbiology*, 77:7815-7822.
 76. Poli MA, Rivera VR, Neal D. 2002. Development of sensitive colorimetric capture ELISAs for *Clostridium botulinum* neurotoxin serotypes E and F. *Toxicon*, 40:797-802.

-
77. Prévot V, Tweepenninckx F, van Nerom E, Linden A, Content J, Kimpe A. 2007. Optimization of polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* type C and D in bovine samples. *Zoonoses and Public Health*, 54:320-327.
 78. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2005. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Artmed, Porto Alegre, pp:347-351.
 79. Rocke TE, Samuel MD, Swift KP, Yarris GS. 2000. Efficacy of a type C botulinism vaccine in greenwinged teal. *J Wildlife Dis*, 36:489-93.
 80. Rosales RL, Bigalke H, Dressler D. 2006. Pharmacology of botulinum toxin: differences between type A preparations. *Europ J Neurol*, 13:2-10.
 81. Rossetto O. 2001. Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. *Toxicol*, 39:27-41.
 82. Rossetto O, Morbiato L, Caccin P, Rigoni M, Montecucco C. 2006. Presynaptic enzymatic neurotoxins. *J Neurochem*, 97:1534-45.
 83. Rupp A, Galban-Horcajo F, Bianchi E, et al. 2013. Anti-GM2 ganglioside antibodies are a biomarker for acute canine polyradiculoneuritis. [J Peripher Nerv Syst](#), 18:75-88.
 84. Rusbridge C. Sistema nervoso. In: Ramsey IK, Tennant BJ (eds.). 2010. *Manual de doenças infecciosas em cães e gatos*. São Paulo: Rocca, pp:270-1.
 85. Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. 2000. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev*, 80:717-766.
 86. Shahrizaila N, Yuki N, Guillain-Barré. 2011. Syndrome Animal Model: The First Proof of Molecular Mimicry in Human Autoimmune Disorder. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Article ID 829129, 5 pages., doi:10.1155/2011/829129.
 87. Shapiro RL, Hatheway C, Swerdlow DL. 1998. Botulism in the United States: a clinical and epidemiologic review. *Ann Intern Med*, 129:221-8.
 88. Sharpe AE, Sharpe EJ, Ryan ED, Clarke HJ, McGettrick SA. 2011. Outbreak of type C botulism in laying hens. *Vet Rec*, 168:669a. doi: [10.1136/vrd1090](#)
 89. Simpson LL, Boroff DA, Fleck U. 1968. Examination of the possible pathophysiology of the central nervous system during botulin poisoning. *Exp Neurol*, 22(1):85-95.
 90. Simpson LL. 2004. Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annual Rev Pharmacol Toxicol*, 44:167-193.

-
91. Smith LDS, Sugiyama H. 1988. Cultural and serological characteristics. In: Smith LDS, Sugiyama H (eds.). *Botulism: the Organism, its Toxins, the Disease*, Charles C. Thomas, Springfield, USA; pp: 23–37.
 92. Sobel J, Tucker N, Sulka A, McLaughlin J, Maslanka S. 2004. Foodborne Botulism in the United States, 1990-2000. *Emerg Infect Dis.*, 10:1606-11.
 93. Sobel J, Malavet M, John S. 2007. Outbreak of clinically mild botulism type E illness from home-salted fish in patients presenting with predominantly gastrointestinal symptoms. *Clin Infect Diseases*, 45:e14-e16.
 94. Sugii S, Ohishi I, Sakaguchi G. 1977. Intestinal absorption of botulinum toxins of different molecular sizes in rats. *Infection and Immunity*, 17:491-496.
 95. Takeda M, Kasai H, Torii Y, Mukamoto M, Kohda T, Tsukamoto K, Kozaki S. 2006. Protective effect of botulinum C/ D mosaic toxoid against avian botulism. *J Vet Med Sc.* 68:325-330.
 96. Taylor SM. 2010. Doenças neuromusculares. In: Nelson RW, Couto CG (eds.). *Medicina interna de pequenos animais*. 4ª ed. São Paulo: Elsevier. p.1104-9.
 97. Tilley LP, Smith JR, Francis WK. 2003. *Consulta veterinária em 5 minutos: espécies canina e felina*. 2a ed. São Paulo: Manole, pp:499-500.
 98. Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. 2002. Botulism and tetanus neurotoxins: Structure, function and therapeutic utility. *Trends Bioch Sc.* 27:552-558.
 99. Van der Lugt JJ, De Wet SC, Bastianello SS, Kellerman TS, Van Jaarsveld LP. 1995. Two outbreaks of type C and type D botulism in sheep and goats in South Africa. *J South Africa Vet Assoc.*, 66:77-82.
 100. van Nes JJ, van der Most, van Spijk D. 1986. Electrophysiological evidence of peripheral nerve dysfunction in six dogs with botulism type C. *Res Vet Sci*, 40:372-6.
 101. Walker EL. Os clostrídeos. In: Hirsh DC, Zee YC (eds.). 1999. *Microbiologia Veterinária*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; pp:220-30.
 102. Wang D, Baudys J, Kalb SR, Barr JR. 2011. Improved detection of botulinum neurotoxin type A in stool by mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 412:67-73.
 103. Werner SB, Passaro D, McGee D, Schechter R, Vugia DJ. 2000. Wound botulism in California, 1951–1998: recent epidemic in heroin injectors. *Clin Infect Dis.*, 31:1018-1024.

-
104. Wictome M, Newton K, Jameson K, Hallis B, Dunnigan P, Mackay E, et al. 1999. Development of an in vitro bioassay for Clostridium botulinum type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl Environ Microbiol*, 65:3787-92.