

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014-2015

**BOTULISME BIJ HOND EN KAT**

door

Daphne VAN WAES

Promotoren: Prof. dr. F. Van Immerseel  
Prof. dr. F. Pasmans

Literatuurstudie in het kader  
van de Masterproef

© 2015 *Daphne Van Waes*



*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.*

*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.*

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014-2015

**BOTULISME BIJ HOND EN KAT**

door

Daphne VAN WAES

Promotoren: Prof. dr. F. Van Immerseel  
Prof. dr. F. Pasmans

Literatuurstudie in het kader  
van de Masterproef

© 2015 *Daphne Van Waes*

## **Woord vooraf**

In dit voorwoord wil ik graag mijn promotoren Prof. dr. F. Van Immerseel en Prof. dr. F. Pasmans bedanken voor de begeleiding en leerrijke samenwerking bij het verwezenlijken van deze literatuurstudie.

Verder wil ik mijn ouders enorm bedanken voor alle financiële, morele en emotionele steun door de jaren heen en om altijd geloofd te hebben in mijn kunnen. Ook wil ik mijn grote broers Cédric en Alexander bedanken om in de moeilijke periodes alles te relativiseren en om na elke examenperiode, ongeacht de uitslag, altijd buitengewoon enthousiast te reageren (ééntje is inderdaad beter dan geentje). Zonder jullie was ik hier nooit geraakt!

Als laatste wil ik ook mijn vrienden bedanken om mij er aan te blijven herinneren dat opgeven geen optie is en om steeds een luisterend oor te bieden.

## Inhoudstabel

Samenvatting .....	1
Inleiding.....	2
1. Etiologie.....	3
2. Pathogenese.....	4
3. Epidemiologie .....	5
4. Botulisme bij de hond.....	7
4.1 Symptomen .....	7
4.2 Diagnose .....	8
4.2.1 Klinisch onderzoek.....	8
4.2.2 Staalname.....	8
4.2.3 Onrechtstreekse detectie van het toxine: Mouse bioassay.....	9
4.2.4 Rechtstreekse detectie van het toxine: ELISA en PCR .....	9
4.2.5 Detectie van antistoffen.....	10
4.3 Differentiaaldiagnose.....	10
4.4 Behandeling .....	12
4.4.1 Ondersteunende therapie .....	12
4.4.2 Antibiotica .....	13
4.5 Prognose.....	13
4.6 Preventie .....	13
5. Botulisme bij de kat.....	14
5.1 Symptomen .....	14
5.2 Diagnose .....	14
5.3 Differentiaaldiagnose.....	15
5.4 Behandeling .....	16
5.5 Prognose.....	16
5.6 Preventie .....	16
6. Bespreking.....	17
7. Referentielijst.....	18

## **Samenvatting**

Botulisme is een neurologische aandoening die veroorzaakt wordt door *Clostridium botulinum*. *C. botulinum* is een anaerobe, sporenvormende, Grampositieve bacterie die wereldwijd voorkomt. Er bestaan 7 verschillende types *C. botulinum* (A-G), maar tot op de dag van vandaag werd bij hond en kat, op één uitzondering na (type D), enkel *C. botulinum* type C gediagnosticeerd. De sporen van de bacterie kunnen teruggevonden worden in het maag-darmstelsel van onder andere honden, katten en vogels en maken er deel uit van de normale intestinale flora. Wanneer een hond of kat echter besmet wordt met het botulinum neurotoxine (BoNT), een toxisch proteïne gevormd door de bacterie, kan dit tot botulisme leiden. De honden en katten worden geïnfecteerd door het opeten van kadavers van vogels die met *C. botulinum* type C besmet zijn. Het is namelijk zo dat wanneer de vogel sterft, de bacterie zich gaat vermenigvuldigen en zich vanuit het intestinaal stelsel naar andere weefsels verspreidt waar dan grote hoeveelheden van het neurotoxine gevormd worden.

Botulisme bij hond en kat wordt gekenmerkt door een gegeneraliseerde paralyse van de perifere motorneuronen van de parasymphaticus doordat de BoNT's de vrijstelling van acetylcholine ter hoogte van de neuromusculaire junctie verhinderen. Bij caninen botulisme zijn in mindere mate ook de craniale zenuwen aangetast, bij felinen botulisme werd dit nog nooit vastgesteld.

Het voornaamste symptoom bij deze intoxicatie is een parese/paralyse van de ledematen. De verlamming begint met een symmetrische zwakte van de achterhand die zich vervolgens uitbreidt naar de voorpoten en uiteindelijk kan leiden tot een tetraplegie. De pijnperceptie ter hoogte van de ledematen blijft echter wel behouden. Bij een zware intoxicatie kan er eventueel een paralyse van de ademhalingspijpen optreden waardoor de dieren stikken en sterven. De ernst van de symptomen is dus afhankelijk van de hoeveelheid opgenomen toxine, maar wordt eveneens bepaald door de individuele gevoeligheid van het dier.

Ondanks het feit dat de diagnose van botulisme op basis van de symptomen en het klinisch onderzoek nooit definitief is, gebeurt dit in de praktijk vrijwel altijd op deze manier. Detectie van het toxine via ELISA is de beste manier om caninen en felinen botulisme aan te tonen. Via ELISA kan aan de hand van stalen van bijvoorbeeld feces of bloed de endopeptidase activiteit van het neurotoxine gemeten worden tijdens het splitsen van artificiële substraten.

Een ondersteunende therapie is van cruciaal belang in de behandeling van botulisme. Spontaan herstel kan namelijk optreden wanneer de dieren goed gemonitord worden en er zich geen secundaire infecties voordoen. Het is uiterst belangrijk dat de dieren voldoende drinken, eten en bewegen en dat, wanneer de opname van het toxine recent is, de inhoud van de maag en darmen zo snel mogelijk verwijderd wordt. Ook is het belangrijk preventief te handelen en honden en katten zoveel mogelijk te weren van kadavers en rauwe vleesproducten.

**Sleutelwoorden: Botulisme – Hond – Kat – Neurotoxine – Paralyse**

## **Inleiding**

Botulisme is een neuroparalytische aandoening die veroorzaakt wordt door een intoxicatie met een neurotoxine geproduceerd door *Clostridium botulinum* (Barsanti, 2006). Sporadisch komt botulisme bij honden en katten voor (*C. botulinum* type C), na het opeten van een kadaver van een vogel besmet met aviaire botulisme en geeft paralyse van de ledematen. Bij erge intoxicatie kan ook respiratoire paralyse optreden en sterven de dieren.

Het voorkomen van aviaire botulisme werd reeds geregistreerd in 17 verschillende landen verspreid over alle continenten uitgezonderd Antarctica (Gupta, 2007), en vormt dus een risico voor honden en katten wereldwijd.

Botulisme werd voor het eerst beschreven op het einde van de 18<sup>de</sup> eeuw in Duitsland nadat verschillende mensen gestorven waren na het eten van worst (botulus: worst (Cornelisse, 1993)). Het duurde echter tot de jaren 1820 vooraleer duidelijk werd dat er het een toxische stof was geweest in de worst die verantwoordelijk was voor deze aandoening. Vanwaar dit gif afkomstig was, kon men toen nog niet achterhalen. Pas op het einde van de 19<sup>de</sup> eeuw heeft men in België (Smith, 1976) ontdekt dat het toxine afkomstig was van een bacterie die we nu kennen als *Clostridium botulinum* (Gupta, 2007).

De bedoeling van deze literatuurstudie is een overzicht te geven over wat er in de literatuur reeds gekend is over caninen en felinen botulisme. Hierbij worden de etiologie, pathogenese, symptomen, diagnose, differentiaaldiagnose, behandeling, prognose en preventie besproken. Ook wordt aviaire botulisme kort toegelicht.



## 1. Etiologie

*C. botulinum* is een Grampositieve, staafvormige bacterie (Barsanti, 2006) die 4-6 µm bij 1 µm groot is en traag motiel (Cornelisse, 1993; Barsanti, 2006). Ze is recht tot licht gebogen en haalt haar voedsel uit dood materiaal (saprofyt) (Barsanti, 2006). De bacteriële kolonies zijn relatief groot en kunnen zich via pseudopodia verspreiden (Cornelisse, 1993). *C. botulinum* is een sporevormende bacterie waarbij de sporen ovaal zijn en subterminaal gelegen (Cornelisse, 1993). Het is een anaeroob organisme dat wereldwijd in grond en modder voorkomt, alsook in het intestinaal stelsel van verschillende dieren maar dan alleen als spore (Barsanti, 2006; Popoff en Bouvet 2013). Het is belangrijk dat de bacterie zich in een anaerobe omgeving bevindt, met een temperatuur tussen de 15° en 45°C (hoewel er al stammen zijn gevonden die groeien bij temperaturen onder de 6°C) en met ruime hoeveelheden aan organisch materiaal opdat de sporen kunnen kiemen tot vegetatieve cellen. Omgekeerd zal blootstelling aan zuurstof, water en een voedseltekort sporulatie uitlokken (Barsanti, 2006; Rosetto et al. 2014). De sporen vertonen resistentie ten opzichte van hitte, licht, droogte en radiatie (Barsanti, 2006) maar worden vernietigd bij verhitting boven 100°C (Smith, 1976).

*C. botulinum* is vanaf een pH hoger dan 4,6 in staat verschillende proteïnen te produceren die een toxische activiteit vertonen, zoals het botulinum neurotoxine (BoNT), het C2 toxine en het C3 exo-enzyme. Van deze eiwitten speelt enkel het BoNT een rol in het veroorzaken van botulisme (Hirsh et al., 2004). BoNTs zijn zink-afhankelijke metalloproteasen die uit drie belangrijke domeinen zijn opgebouwd: twee hiervan zorgen voor de binding tussen het BoNT en de zenuwuiteinden met translocatie van het toxine in het neurologische cytosol, terwijl het derde deel de vrijstelling van acetylcholine ter hoogte van de neuromusculaire presynaps verhindert (Tjalsma, 1990; Barsanti, 2006; Gupta, 2007). Op basis van dit exotoxine worden er 7 verschillende types *C. botulinum* onderscheiden: *C. botulinum* A-G. De BoNT's van al deze types hebben een vergelijkbare structuur en eenzelfde neurotoxisch effect (Barsanti, 2006). Het eigenlijke actieve neurotoxine heeft steeds een moleculaire massa van 150 kDa maar doordat elk serotype bindt met proteïnen van een andere gastheer, resulteert dit in een verschil in moleculaire massa tussen de verschillende types (Gupta, 2007). Ook vertonen de BoNT's een verschil in receptor affiniteit wat een reden is voor de verschillen in gevoeligheid tussen de diersoorten voor bepaalde types *C. botulinum* (Barsanti, 2007). Types A, B, E en F worden hoofdzakelijk geassocieerd met humane intoxicaties. Ziekte veroorzaakt door type B en D wordt vooral gezien bij herbivoren (paarden en runderen) terwijl type C overheerst bij watervogels en bedrijfspluimvee en sporadisch voorkomt bij carnivoren (hond en kat). Type C en D vermeerderen enkel in een substraat dat dierlijke eiwitten bevat, zoals bedorven vlees of kadavers van vogels die stierven aan botulisme. Er zijn nog geen aandoeningen in verband gebracht met type G (Smith, 1976; Tjalsma, 1990; Cornelisse, 1993; Elad et al., 2004; Barsanti, 2006).

Tot op vandaag zijn er bij honden en katten enkel meldingen van botulisme veroorzaakt door *C. botulinum* type C met de uitzondering van 2 gevallen (honden) in Senegal waar het om type D ging (Elad et al., 2004; Barsanti 2006)

## 2. Pathogenese

De BoNT's gevormd door *C. botulinum* veroorzaken een paralyse van de perifere motorneuronen ter hoogte van het parasympatische zenuwstelsel doordat het de presynaptische vrijstelling van acetylcholine (Ach) ter hoogte van de neuromusculaire junctie tegenwerkt. Dit geeft inhibitie van zowel de spontane vrijstelling van Ach, als van deze veroorzaakt door een zenuwactiepotentiaal (Pellizzari et al., 1999; Barsanti, 2006).

De botulinum neurotoxines gaan na opname de epitheliale barrière van het intestinale stelsel van de hond passeren en zo langs de lymfe door endocytose (Barsanti, 2006) de bloedbaan bereiken (Simpson, 2013). Nu is het zo dat deze neurotoxines te groot zijn om de intacte bloed-hersenbarrière te passeren en dus via deze weg het centrale zenuwstelsel niet kunnen binnendringen (Gupta, 2007; Rosetto et al., 2014). Hierdoor is hun werking beperkt tot de perifere cholinerge systemen van het autonome zenuwstelsel waar Ach de primaire neurotransmitter is (Gupta, 2007). De BoNT's zijn proteïnen die bestaan uit drie primaire domeinen: een heavy chain met C-terminus, een heavy chain met N-terminus en een light chain (Barsanti, 2006; Rosetto et al.; 2014). De heavy chain heeft een moleculaire massa van 100kDa, de light chain van 50 kDa (Gupta, 2007). Elk van deze domeinen spelen een cruciale rol in de aantasting van de cholinerge zenuwuiteinden:

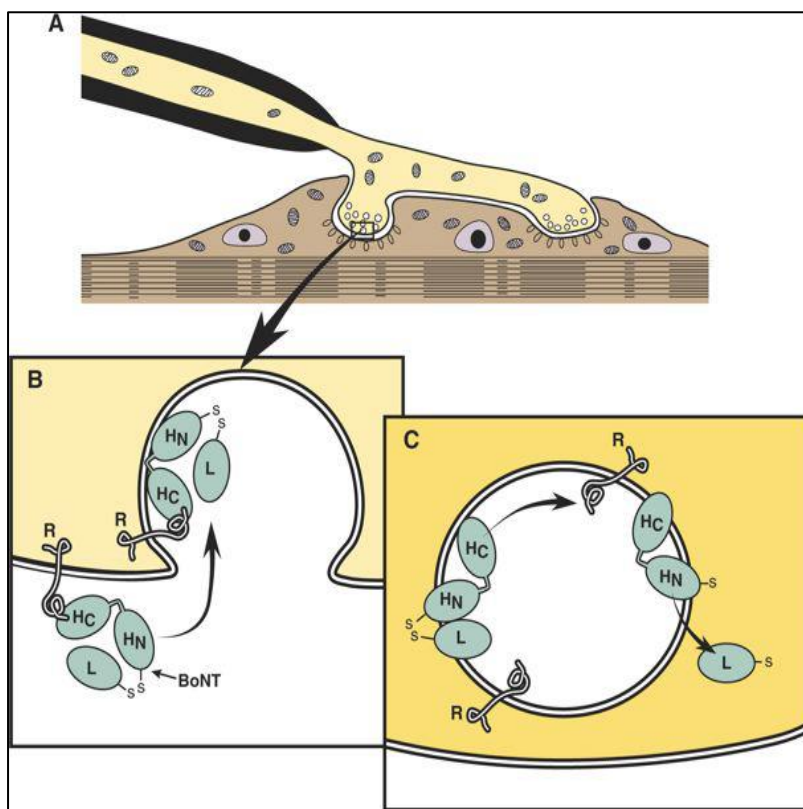
1. De C-terminus van de heavy chain is verantwoordelijk voor de selectieve binding van het toxine met de receptor van het presynaptische membraan (Montecucco, 1986; Barsanti, 2006). Deze binding gebeurt snel, is irreversibel en onafhankelijk van temperatuur of neuronale activiteit. Het feit dat minieme hoeveelheden toxine reeds sterfte veroorzaken, betekent dat deze membraanreceptoren een enorm hoge affiniteit moeten hebben voor dit neurotoxine (Barsanti, 2006).
2. Vervolgens veroorzaakt de heavy chain met N-terminus een receptor-gemedieerde translocatie van de BoNT's ter hoogte van het presynaptische membraan aan de hand van endosomen (Barsanti, 2006). Binnenin de endosomen wordt de disulfidebrug tussen de heavy chain en de light chain verbroken (Gupta, 2007). De translocatie vereist een lagere pH. Door de lagere zuurtegraad wordt het toxine meer hydrofoob waardoor deze de bilipidelaag kan penetreren (Barsanti, 2006).
3. De verlaagde endosomale pH zorgt er eveneens voor dat de light chain, een metallo-proteïne dat zink bevat, kan ontsnappen naar het cytosol. Daar gaat de light chain zorgen voor een onderbreking van de vrijstelling van Ach via een zink-afhankelijke splitsing van de SNARE proteïnen. De SNARE proteïnen vormen het neuro-exocytose apparaat van de cholinerge zenuwuiteinden wat betekent dat zij verantwoordelijk zijn voor de vrijstelling van Ach in de neuromusculaire junctie. Zij zorgen namelijk voor de fusie tussen de synaptische vesikels met het presynaptische membraan (Barsanti, 2006).

Er zijn drie SNARE proteïnen: SNAP-25 (synaptosomaal-geassocieerd proteïne van 25 kDa), VAMP (vesikel-geassocieerd membraan proteïne) en syntaxin (Pantano en Montecucco, 2014). Proteolyse van slechts een klein deeltje van het SNARE complex is voldoende om de vrijstelling van Ach te verhinderen (Barsanti, 2006).

Welke proteïnen dan gesplitst worden is afhankelijk van het type BoNT dat aanwezig is. BoNT type A en E splitsen SNAP-25, BoNT type B, D, F en G splitsen het VAMP (Gupta, 2007). BoNT type C, vrijwel het enige type toxine dat tot nu toe bij hond en kat werd teruggevonden, richt zich tot het splitsen van syntaxin en in mindere mate van SNAP-25 (Barsanti, 2006; Rosetto et al., 2014).

Splitsing van syntaxin voorkomt G-proteïne (guanine nucleotide bindende eiwit) regulatie van de calcium-kanalen die een rol spelen in de vrijstelling van Ach ter hoogte van het presynaptische membraan. Normaal gezien veroorzaakt een calcium influx doorheen deze ion-kanalen een fusie tussen de vesikels met vrijstelling van de neurotransmitter in de synaptische spleet tot gevolg.

BoNT type C verandert dus niet aan het aantal, de vorm of de distributie van de vesikels, maar belet enkel het versmelten ervan waardoor Ach niet langer kan worden vrijgesteld. Botulisme leidt dus niet tot afsterven van de aangetaste neuronen maar geeft wel een degeneratie en paralyse van de beschadigde synaps (Barsanti, 2006).



A. Plaats waar het neurotoxine inwerkt: ter hoogte van de neuromusculaire eindplaat

B. De zware keten met C-terminus van het BoNT bindt met de membraanreceptor van het zenuwuiteinde. De zware keten met N-terminus zorgt via endocytose voor de eigenlijke opname in de zenuw.

C. De lichte keten dringt doorheen de bilipidelaag van het endosoom en komt in het cytosol van het neuron terecht. Daar worden de SNARE-proteïnen verantwoordelijk voor de vrijstelling van acetylcholine geknipt.

Fig. 1 Binding van het botulinum neurotoxine met een membraanreceptor ter hoogte van de neuromusculaire eindplaat (Barsanti, 2006).

### 3. Epidemiologie

Er zijn verschillende manieren waarop *C. botulinum* type C zich kan verspreiden. Voorbeelden zijn via wondinfectie of door het oraal opnemen van sporen (Hirsh et al., 2004). Echter uit de studies blijkt dat honden (en katten) hoofdzakelijk besmet worden door het opnemen van het BoNT via het eten van gecontamineerde karkassen van watervogels en pluimvee (Tjalsma, 1990; Bruchim et al., 2006, Uriate et al., 2010). Daarom wordt in de volgende paragraaf dieper ingegaan op aviaire botulisme.

Op wereldwijde basis is aviair botulisme de belangrijkste aandoening die voorkomt bij migrerende vogels, en dan vooral bij water- en kustvogels maar ook, weliswaar in mindere mate bij bedrijfspluimvee (Tjalsma, 1990). Zo zijn er de laatste 100 jaar vooral in Noord-Amerika verscheidene massale uitbraken geweest waar het dodental soms tot miljoenen opliep, maar ook Europa is niet gespaard gebleven. Zo heeft bijvoorbeeld Nederland in 1970 te maken gehad met een uitbraak van aviair botulisme, wel van een minder grote omvang (Rocke en Bollinger, 2007).

De etiologie van botulisme bij deze dieren bestaat uit een complexe cyclus die contaminatie vanuit de omgeving, toxico-infectie, sterven van de vogels, proliferatie van de bacterie in de karkassen en invertebraten als vector omvat. *C. botulinum* koloniseert vaak het intestinale stelsel van klinisch normale vogels wat de kans op een toxico-infectie verhoogt. Wanneer deze vogels sterven, vermenigvuldigt de bacterie en migreert ze vanuit de gastro-intestinale tractus naar andere weefsels wat kan leiden tot de vorming van hoge concentraties van het BoNT (Trampel et al., 2005). De karkassen van de vogels vormen namelijk een uitstekend groeimedium voor de bacterie en zorgen voor een gepast micro-milieu wanneer de omgeving niet voldoet aan de noden van de bacterie om zich te vermenigvuldigen. Het toxine wordt overgebracht naar andere vogels door de tussenkomst van larven van tweevleugeligen zoals vliegen en muggen. Deze invertebraten zijn zelf niet gevoelig voor het toxine maar kunnen aanzienlijke hoeveelheden van het toxine verzamelen door het opnemen van het rottende vlees. Wanneer andere vogels deze larven opeten, kan dat leiden tot botulisme (Smith, 1976). De meest significante risicofactor voor botulisme bij vogels is het foerageergedrag. Watervogels zoals eenden die hun voedsel uit grond en water filteren en kustvogels zoals strandlopers die hun voedsel zoeken in de oppervlakte van waterrijke bodems lopen het grootste gevaar op een besmetting (Rocke en Bollinger, 2007). Elementen die de kans op een uitbraak van botulisme bij watervogels vergroten zijn: een langere periode van warm weer, grote gebieden met ondiep stilstaand water, een alkalisch milieu, een overmaat aan invertebrata in een waterrijke omgeving en een zuurstoftekort samen met grote hoeveelheden rottend organisch materiaal (Smith, 1976). Preventie van uitbraken bij watervogels kan het beste gedaan worden door de kans op de proliferatie van *C. botulinum* in de karkassen van dode vertebraten en invertebraten zoveel mogelijk te reduceren. Dit doet men onder andere door dode vogels te verwijderen en troepen vogels weg te houden van oevers geassocieerd met botulisme. Ook moet men extra aandachtig zijn bij gebieden die regelmatig overstromen. Deze kunnen namelijk aanleiding geven tot sterfte van invertebraten die niet overleven in water wat een groot risico vormt voor de vogels (Gupta, 2007).

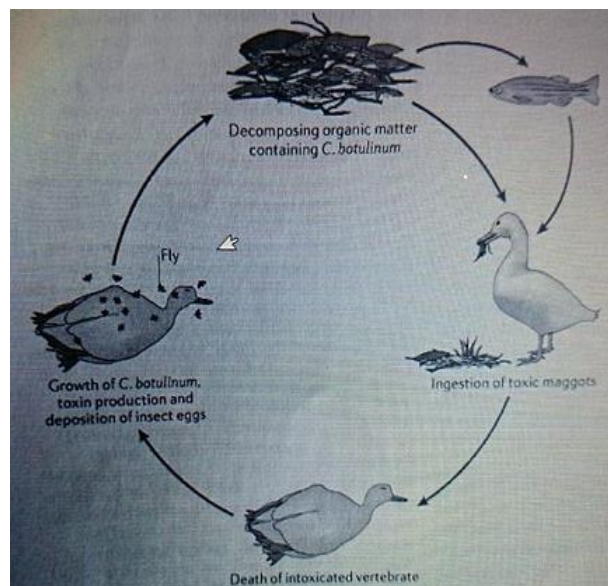


Fig. 2 Pathogenese aviair botulisme (Rosetto et al., 2014).

## 4. Botulisme bij de hond

### 4.1 Symptomen

Canien botulisme wordt gekenmerkt door een gegeneraliseerde dysfunctie van de perifere motorneuronen en in mindere mate door stoornissen ter hoogte van de craniale zenuwen en het autonome zenuwstelsel (Barsanti, 2006). De incubatieperiode varieert van enkele uren tot 6 dagen.

De ernst van het ziektebeeld wordt enerzijds bepaald door de opgenomen hoeveelheid toxine: hoe eerder de symptomen zich voordoen, hoe ernstiger de intoxicatie. Anderzijds speelt de individuele gevoeligheid van het dier een rol (Tjalsma, 1990; Barsanti, 2006).

Intoxicaties beginnen met een progressieve, symmetrische en ascenderende zwakte van de achterhand die zich vervolgens uitbreidt naar de voorste ledematen en kan resulteren in tetraplegie (Barsanti, 2006). Er is een verlies van spinale reflexen en houdingsreflexen, maar de pijnperceptie in de ledematen blijft aanwezig (Tjalsma, 1990). Beweging van de staart wordt eveneens behouden (Barsanti, 2006).

Tijdens het verder verloop van de intoxicatie worden ook de craniale zenuwen vaak aangetast wat kan resulteren in (Barsanti, 2006): tremor van de masseter- en de temporaalspieren (Gupta, 2007), kauw- en slikproblemen met gedeeltelijke verlammingen van de tong die soms uit de bek hangt door aantasting van de nervus glossopharyngeus, mydriasis met verzwakte pupillaire lichtrespons en verzwakte ooglidreflex door het uitvallen van de nervus oculomotorius (Cornelisse, 1993), verhoogde wurgregreflex met hypersalivatie en een verminderde vocalisatie (Barsanti, 2006). De verzwakte palpebrale reflex kan aanleiding geven tot het ontstaan van conjunctivitis en ulceratieve keratitis. Hyperemische conjunctiva en een negatieve Shirmer tear test (een eenvoudig uit te voeren test die de traanproductie meet) kunnen eveneens voorkomen (Gupta, 2007). Mentaal gezien vertonen de honden geen afwijkingen (Barsanti, 2006). Daarnaast kunnen ook megaoesophagus, urinaire retentie, constipatie en spieratrofie aangetroffen worden (Tjalsma, 1990). De spieratrofie is variabel doorheen het verloop van de ziekte (Barsanti, 2006).

De hart- en ademhalingsfrequenties zijn variabel: zowel bradycardie als tachycardie werd vastgesteld bij geïntoxiceerde honden, evenals brachypnee en tachypnee. Bij ernstig besmette honden kan de spiertonus van de abdominale spieren afnemen waardoor een diafragmatische ademhaling optreedt (Barsanti, 2006).

Mogelijke secundaire complicaties zijn aspiratiepneumonie, bilaterale keratoconjunctivitis sicca ten gevolge van de verminderde traanproductie en urineweginfecties.



Fig. 3 Hond met botulisme: normale pijnperceptie maar geen terugtrekreflex. Gedilateerde pupil (Barsanti, 2007).

Bij een ernstige intoxicatie kan een paralyse van de ademhalingspijeren optreden waardoor de dieren stikken. Secundair kan een progressieve pneumonie of een urineweginfectie eveneens sterfte veroorzaken (Barsanti, 2006; Gupta, 2007).

## 4.2 Diagnose

### 4.2.1 Klinisch onderzoek

Op basis van het klinisch onderzoek en bovenstaande symptomen kan een infectie met *C. botulinum* vermoed worden, maar nooit bevestigd. De definitieve diagnose moet steeds aangetoond worden aan de hand van laboratoriumtesten (Cornelisse, 1993).

Alle resultaten van een routine labo onderzoek (volledig bloedonderzoek, biochemische analyse en urineonderzoek) liggen bij een botulisme-intoxicatie binnen de referentiewaarden (Bruchim et al., 2006; Gupta, 2007), tenzij er secundaire complicaties aanwezig zijn zoals een luchtweginfectie (bv. aspiratiepneumonie), een huidinfectie (bv. doorligwonde) of dehydratatie. Het cerebrospinaal vocht vertoont eveneens geen afwijkingen (Barsanti, 2006).

Bij een radiografie van de thorax kan men soms een megaoesophagus opmerken, wat het vermoeden van botulisme doet toenemen (Barsanti, 2006). Wanneer een aspiratiepneumonie aanwezig is, kan men dit ook via deze weg vaststellen (Gupta, 2007). Deze complicaties zijn echter geen bewijs van botulisme (Hirsh et al., 2004).

Een elektromyografie (EMG) toont aan dat het niet goed functioneren van de perifere motorneuronen bij klinisch zieke dieren besmet met *C. botulinum* te wijten is aan een probleem ter hoogte van de neuromusculaire juncties. Wanneer een motor neuron gestimuleerd wordt, vertonen de potentialen van de motorische eenheden een lagere amplitude dan normaal. Deze dalingen zijn variabel bij repetitieve stimulatie. Ook fibrillatie potentialen kunnen soms opgemerkt worden maar niet altijd. Men vermoedt dat dit afhangt van het moment waarop het EMG wordt uitgevoerd. In één onderzoek werd eveneens een milde vermindering in de snelheid van de zenuwgeleiding gezien. Omdat de resultaten van een EMG relatief moeilijk te interpreteren zijn en het risico op een verkeerde diagnose dus reëel is, zijn elektromyografen met veel ervaring essentieel (Barsanti, 2006).

### 4.2.2 Staalname

Om een definitieve diagnose te stellen moet het neurotoxine geïdentificeerd worden in serum, braaksel, maaginhoud of feces van verdachte dieren voor sterfte of bij verse kadavers (Tjalsma, 1990; Cornelisse, 1993; Hirsh et al., 2004; Barsanti, 2006; Bruchim et al., 2006).

Deze stalen moeten bewaard worden in de koelkast en zo snel mogelijk onderzocht worden, maar mogen niet ingevroren worden tenzij de kans reëel is dat de analyse pas na enkele dagen kan uitgevoerd worden. Transport van de stalen gebeurt best in een steriele, lekvrije doos. Deze wordt dan in een geïsoleerde container met koelvloeistof verzonden.

Op deze container moet duidelijk vermeld staan dat de inhoud potentieel gevaarlijk is en bij aankomst onmiddellijk koel geplaatst moet worden (Barsanti, 2006).

#### **4.2.3 Onrechtstreekse detectie van het toxine: Mouse bioassay**

De gouden standaard en meest betrouwbare test voor het aantonen van canien botulisme is de Mouse bioassay (MBA) of muis inoculatietest. Bij deze test worden bij honden die verdacht worden van botulisme stalen genomen. Dit kan serum zijn ( $\pm 10$ ml), voedsel, een staal (50 gram) van de feces, van het braaksel of van de maaginhoud van het dier (Barsanti, 2006) of een stukje leverweefsel dat dan gehomogeniseerd wordt (Tjalsma, 1990). Dit serum of staal wordt vervolgens alleen, in combinatie met een type specifiek antitoxine intra-peritoneaal of alleen na verhitting geïnjecteerd bij groepen muizen of cavia's (Hirsh et al., 2004; Barsanti, 2006).

Deze proefdieren worden dan gecontroleerd op tekenen van botulisme (Barsanti, 2006) en er wordt uitgezocht met welk specifiek antitoxine de toxische werking wordt geneutraliseerd (Cornelisse, 1993). Wanneer de groep muizen die enkel met het staal geïnoculeerd werd symptomen van botulisme vertoont en sterft, en als de andere groep beschermd door het antitoxine overleeft, dan bevestigt dit de aanwezigheid van het BoNT (Barsanti, 2006).

De MBA test houdt ook risico's in voor de onderzoekers. Zeer kleine hoeveelheden van het neurotoxine kunnen via ingestie, inhalatie of absorptie doorheen het oog of een wonde in de huid opgenomen worden en intoxicatie veroorzaken.

#### **4.2.4 Rechtstreekse detectie van het toxine: ELISA en PCR**

Omdat men het gebruik van proefdieren voor het testen van toxiciteit wil beperken en omdat de MBA vrij duur is, heeft men zich de laatste jaren toegelegd op het ontwikkelen van in vitro testen, (Rocke et al., 1998; Trampel et al., 2005) om de MBA als dé diagnostische test bij uitstek te vervangen. (Barsanti, 2006). Verschillende enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA's) werden ontworpen die de endopeptidase activiteit van het neurotoxine meten tijdens het splitsen van artificiële substraten. Deze testen werden reeds gebruikt om het BoNT in voedsel bij humane uitbraken op te sporen (Barsanti, 2006). Ook in Duitsland heeft men via deze assays op een bedrijf verdacht van botulisme in stalen van feces, bloed, organen en maagdarmsappen van gestorven en geëuthanaseerde runderen; alsook in aarde, water en kuilvoeder het *C. botulinum* neurotoxine teruggevonden (Krüger et al, 2014). Bovendien kunnen met de ELISA zowel actieve als inactieve vormen van het toxine maar ook subeenheden van het toxine gedetecteerd worden terwijl met de MBA enkel biologisch actief toxine kan opgespoord worden (Rocke et al., 1998). Meer recent werden ook PCR (polymerase chain reaction) methodes gebruikt om bij gecasteerde hanen genen te detecteren die coderen voor het BoNT type C in feces stalen (Trampel et al.; 2005).

#### **4.2.5 Detectie van antistoffen**

Wanneer het uitvoeren van een definitieve diagnose om een bepaalde reden niet mogelijk is, kan het meten van de hoeveelheid antistof tegen het BoNT in het serum van de aangetaste hond een handig hulpmiddel zijn om het vermoeden van botulisme te ondersteunen. Hierbij worden gepaarde sera genomen met een interval van drie weken. Een stijging van de antistof-titer na drie weken toont aan dat *C. botulinum* in het lichaam aanwezig is (Bruchim et al., 2006).

Het terugvinden van het neurotoxine in feces, maaginhoud of braaksel steunt de diagnose van botulisme, maar bevestigt deze niet, omdat de bacterie bij gezonde honden op deze plaatsen ook kan voorkomen. Wanneer deze bevindingen echter samengaan met bovenstaande symptomen mag men er vanuit gaan dat het om een *C. botulinum* intoxicatie gaat (Hirsh et al., 2004; Gupta, 2007).

Omdat de definitieve diagnose in het labo vaak moeilijk en vooral duur is, wordt in de praktijk de diagnose van botulisme toch vrijwel altijd alleen op de anamnese en klinische symptomen gebaseerd (Bruchim et al., 2006).

#### **4.3 Differentiaaldiagnose**

De differentiaaldiagnose voor botulisme bestaat hoofdzakelijk uit polyradiculoneuritis, myasthenia gravis, polymyositis, tekenbeetparalyse en orgaanfosfaat intoxicatie. Deze aandoeningen tasten net zoals botulisme de perifere motorneuronen aan. Toch zijn er subtiele verschillen tussen deze ziekten waardoor men vaak de differentiaaldiagnose kan beperken.

##### *Idiopathische acute polyradiculoneuritis*

Idiopathische acute polyradiculoneuritis is een perifere inflammatoire neuropathie die gekenmerkt wordt door een variërende graad van axonale degeneratie en demyelinisatie van zenuwwortels (Barsanti, 2006; Uriate et al.; 2010).

##### Gelijkenissen met botulisme (Uriate et al., 2010):

- >Verminderde reflexen en een progressieve tetraparese/tetraplegie
- >Afwijkende elektromyografie
- >Bemoeilijkte ademhaling

##### Verschillen met botulisme (Barsanti, 2006; Uriate et al., 2010):

- >Overgevoeligheid bij manipulatie van spieren
- >Geen aantasting van de craniale zenuwen en het autonome zenuwstelsel
- >Geen aanwezigheid van een megaoesophagus



### Myasthenia gravis

Myasthenia gravis is een auto-immuun ziekte waarbij acetylcholine zich niet meer kan binden aan de nicotine receptoren ter hoogte van de motorische eindplaat (Gupta, 2007; Uriate et al., 2010).

#### Gelijkenissen met botulisme:

->Aanwezigheid van een megaoesophagus

#### Verschillen met botulisme:

->Normale reflexen

->Normale elektromyografie

->Extreme vermoeidheid

### Polymyositis

Polymyositis is een chronische ontsteking van de spieren van de ledematen. De ontsteking maakt spiercellen kapot waardoor er verlies van spierkracht optreedt.

#### Gelijkenissen met botulisme:

->Musculaire zwakte

->Aanwezigheid van een megaoesophagus (Van Ham et al., 2009)

#### Verschillen met botulisme:

->Overgevoeligheid bij manipulatie van spieren

### Tekenbeetparalyse

Teken kunnen bij honden en katten de ziekte van Lyme overbrengen. Dit is een infectieziekte die veroorzaakt wordt door de bacterie *Borrelia burgdorferia* (Gupta, 2007).

#### Gelijkenissen met botulisme:

->Verminderde reflexen en een progressieve tetraparese/tetraplegie

->Afwijkende elektromyografie

->Megaoesophagus

#### Verschillen met botulisme:

->Geen aantasting van de craniale zenuwen en het autonome zenuwstelsel

->Koorts

### Orgaanfosfaat (carbamaat) intoxicatie

Orgaanfosfaat en carbamaat zijn acetylcholine remmers die onder andere in insecticiden teruggevonden worden (Barsanti, 2006).

#### Gelijkenissen met botulisme:

->Aantasting van de perifere motorneuronen

->Megaoesophagus (Van Ham et al., 2009)

#### Verschillen met botulisme:

->Geen aantasting van de craniale zenuwen en het autonome zenuwstelsel

->Braken en diarree

## 4.4 Behandeling

### 4.4.1 Ondersteunende therapie

In de behandeling van botulisme is ondersteunende therapie zeer belangrijk aangezien spontaan herstel kan optreden wanneer de hoeveelheid ingenomen toxine beperkt is. Hierbij is het vermijden van secundaire infecties, bijvoorbeeld ter hoogte van de lucht- of urinewegen, van cruciaal belang.

Wanneer de ingestie van het toxine acuut is, kan het nuttig zijn om de inhoud van de gastro-intestinale tractus te verwijderen om zo de toxine-absorptie in maag en darm te verminderen. Hiervoor maakt men gebruik van maag- en darmspoelingen en laxeer- en purgeermiddelen.

Suppletie van vocht moet hier indien nodig aangewend worden om de hydratietoestand van de patiënten op een normaal niveau te houden.

Magnesium bevattende laxativa en purgativa moeten vermeden worden omwille van het theoretische vermoeden dat magnesium de werking van het neurotoxine zou versterken.

Het is heel belangrijk dat aangetaste dieren voldoende eten, drinken en bewegen en dat zij hierbij geholpen worden wanneer ze dit zelf niet kunnen. Wanneer de dieren zelf nog kunnen slikken, worden ze via orale weg van voedsel en vocht voorzien. Wanneer dit echter niet meer lukt, gaat men over op een parenterale voedsel- en vloeistoftherapie. De dieren moeten continue gemonitord worden voor aspiratiepneumonie ten gevolge van een megaoesophagus en verminderde wurgregreflex. Bij ademnood is mechanische ventilatie nodig.

Er moet regelmatig gecontroleerd worden of de dieren nog in staat zijn te urineren. Kunnen zij die niet langer, dan moet de blaas handmatig leeggemaakt worden. Dit is heel belangrijk om de kans op het voorkomen van urineweginfecties te verminderen. Bij constipatie kunnen de dieren geholpen worden met een darmspoeling of laxeermiddel.

Om doorligwonden te voorkomen is het noodzakelijk om de patiënten te voorzien van een zachte ondergrond om op te liggen. Frequent herpositioneren mag ook niet vergeten worden.

Topicale oogzalven moeten aangebracht worden om uitdroging en keratitis te voorkomen welke kunnen ontstaan door een verminderde ooglidreflex en traanproductie (Barsanti, 2006; Gupta, 2007).

#### **4.4.2 Antibiotica**

Het gebruik van antibiotica heeft geen zin bij de behandeling van botulisme maar wanneer de patiënt te maken krijgt met een secundaire infectie kan het toch noodzakelijk zijn. Wel moet men indachtig zijn dat deze antibiotica de intestinale flora kan wijzigen, wat de groei van *C.botulinum* mogelijk maakt. Ook gebruikt men beter geen aminoglycosiden omdat zij potentieel de neurotransmitters zouden kunnen blokkeren (Barsanti, 2006).

#### **4.5 Prognose**

Botulisme kan letaal zijn en moet daarom steeds als een spoedgeval beschouwd worden (Uriate et al., 2010). Echter wanneer geen secundaire complicaties optreden, is de prognose voor canien botulisme vrij goed (Gupta, 2007). Doordat de eindplaten zich herorganiseren wordt de Ach-vrijstelling hersteld en is een ondersteunende therapie hierbij voldoende om de dieren er bovenop te krijgen (Uriate et al., 2010).

Herstel treedt op in omgekeerde volgorde als waarin de symptomen optreden. Dit betekent dus dat de functie van de craniale zenuwen en de motorische functie van de nek en voorpoten zich als eerste zal normaliseren. De herstelperiode duurt ongeveer 14-24 dagen (Barsanti, 2006).

#### **4.6 Preventie**

Het is zeer belangrijk om huisdieren zoveel mogelijk te weren van kadavers en om alle vleesproducten die aan de dieren gegeven wordt voldoende te koken.

Voedsel moet gedurende 30 minuten op 80°C verwarmd worden of gedurende 10 minuten op 100°C opdat het neurotoxine volledig vernietigd is. Dieren bouwen geen immuniteit op na een infectie met *C. botulinum*.

Vooraf bij jachthonden die de eerder vermelde symptomen vertonen, mag botulisme nooit ontbreken in de differentiaaldiagnose aangezien zij regelmatig in contact komen met rauw vlees (Barsanti, 2006).

Hoewel er verschillende species zoals schapen en runderen (Australië en Zuid-Afrika) succesvol gevaccineerd kunnen worden tegen botulisme, bestaat er tot op heden nog geen vaccin voor hond of kat (Cornelisse, 1993).

## 5. Botulisme bij de kat

Tot op heden is er slechts 1 case beschreven van felien botulisme (Israël) waarbij de katten op een natuurlijke manier geïnfecteerd werden. Acht katten werden besmet met *C. botulinum* type C nadat hen vlees van een gestorven pelikaan gevoederd werd die gevonden was in de buurt van een visvijver.

### 5.1 Symptomen

Drie dagen na eten van het besmette vlees gaven alle 8 katten een algemene slechte indruk en hadden ze allen anorexie. Een van de katten bleef zelfs platliggen, vertoonde dyspnee en paralyse van de achterhand.

De dag erna vertoonde een tweede kat gelijkaardige symptomen en werd tetraplegisch. Drie andere katten kregen ook deze verschijnselen, maar minder ernstig.

In de volgende dagen stierf 50% van de katten. Van de overige 4 katten deden 3 dieren het progressief beter en herstelden uiteindelijk, 1 kat bleef ziek.

Twee katten die tot dezelfde groep behoren maar afwezig waren op het moment dat het vlees gevoederd werd, bleven de hele tijd gezond wat het vermoeden dat het vlees van de pelikaan verantwoordelijk was voor het ziek worden van de andere katten bevestigde.

De zieke kat, een 5 maand oude intacte kater, werd verder onderzocht in een universitaire dierenkliniek. Uit klinisch onderzoek bleek dat het dier hypothermie (35.8°C), tachycardie (200 slagen/min) en milde dehydratie (6%) had. Er was tetraparese, spinale reflexen waren afwezig in de achterpoten en heel zwak aanwezig in de voorpoten, pijnperceptie was wel aanwezig.

In tegenstelling tot caninen botulisme werden bij geen van deze katten abnormaliteiten gevonden ter hoogte van de craniale zenuwen.

Bij het bloedonderzoek werd enkel een milde stijging van het aantal neutrofielen teruggevonden ( $18 \times 10^9$  neutrofielen/liter). De biochemische analyse toonde een milde stijging van de albumine concentratie (40g/liter), een gedaalde ureum concentratie (10.57 mmol/liter) en een gestegen lactaat dehydrogenase (431 U/liter) en creatinine kinase (732 U/liter) activiteit. Of dit echter gevolgen zijn van de intoxicatie is niet geweten.

De urineanalyse en glucose concentratie waren volledig normaal.

### 5.2 Diagnose

Serum van 1 zieke kat, maaginhoud van 2 gestorven katten en spierweefsel van de pelikaan werden onderzocht op de aanwezigheid van een botulinum neurotoxine.

De maaginhoud werd 10 min gecentrifugeerd in combinatie met een fosfaat buffer bij een pH van 6.

Na centrifugatie werd een deel van het supernatans verhit tot 80°C gedurende 20 min en gebruikt als negatieve controle. Het spierweefsel van de pelikaan werd gemalen met behulp van steriele glasparsels en vervolgens op de zelfde manier als de maaginhoud gecentrifugeerd.

Vervolgens werden 0.5 ml van het serum en 1 ml van het supernatans van de maaginhoud, van het spierweefsel en van het geïnactiveerde supernatans intraperitoneaal ingespoten bij telkens 2 muizen.

Wanneer beide muizen stierven binnen 96 uur na inoculatie werd de Mouse bioassay uitgevoerd.

Bij deze test werd het supernatans gecombineerd met antitoxine B, C en D aan een 5:1 ratio en 30 min lang geïncubeerd bij 37°C. 5 groepjes van telkens 2 muizen werden vervolgens geïnculeerd:

->groep 1: onbehandeld supernatans

->groep 2: supernatans + antitoxine type B

->groep 3: supernatans + antitoxine type C

->groep 4: supernatans + antitoxine type D

->groep 5: geïnactiveerd supernatans

Het overleven van de muizen geïnculeerd met het geïnactiveerde supernatans (groep 5) en van de muizen ingespoten met supernatans en antitoxine type C (groep 3) betekende dat de katten gestorven waren aan een *C. botulinum* type C intoxicatie.

Daarnaast heeft men spierweefsel van de pelikaan en de maaginhoud van de katten onderzocht op de aanwezigheid van toxicogene *C. botulinum* bacteriën. De monsters werden geïnculeerd in buisjes met een medium van ei en gedurende 20 min verhit tot 80°C.

Dan werden de buisjes verzegeld met paraffine olie en voor 5 dagen geïncubeerd op 33°C. De suspensies werden vervolgens gecentrifugeerd en het 0.5 ml van het supernatans werd subcutaan geïnculeerd bij 2 muizen. De aanwezigheid van de bacterie werd in het spierweefsel van de pelikaan en in de maaginhoud van één kat bevestigd.

### 5.3 Differentiaaldiagnose

#### *Idiopathische acute polyradiculoneuritis*

Op basis van de anamnese, het ascenderende verloop van de neurologische symptomen en het feit dat het herstel eerst optrad in de voorste ledematen en daarna in de achterste zoals bij canien botulisme werd deze aandoening uitgesloten.

#### *Tekenbeetparalyse*

De aanwezigheid van teken was in Israël op dat moment nog nooit gerapporteerd en werd daarom ook niet waarschijnlijk als mogelijke oorzaak.

### Myasthenia gravis

Myasthenia gravis werd uitgesloten op basis van het herstel van de kater zonder specifieke therapie tegen deze ziekte.

### Orgaanfosfaat (carbamaat) intoxicatie

Insecticide vergiftiging werd uitgesloten na gas chromatografie/ massaspectrometrie van de maaginhoud van de gestorven katten.

## 5.4 Behandeling

Gedurende de eerste 24 uur na opname was de kat niet in staat zelfstandig te urineren en werd de blaas handmatig leeggedrukt.

De kat werd aan een infuus gelegd met Ringer lactaat (10 ml/uur) en elke 8 uur werd 75 mg antibioticum (ampicilline) toegediend.

De kat deed het heel snel beter en mocht 56 uur na opname al terug naar huis. Op dat moment vertoonde het dier nog een lichte paraparese maar de kater herstelde thuis volledig (Elad et al., 2004).

## 5.5 Prognose

Botulisme kan letaal zijn en moet daarom steeds als een spoedgeval beschouwd worden. Echter wanneer geen secundaire complicaties optreden, is de prognose voor felien botulisme vrij goed. Doordat de eindplaten zich herorganiseren wordt de Ach-vrijstelling hersteld en is een ondersteunende therapie hierbij voldoende om de dieren er bovenop te krijgen (Uriate et al., 2010). Herstel treedt op in omgekeerde volgorde als waarin de symptomen optreden. Dit betekent dus dat de functie van de motorische functie van de nek en voorpoten zich als eerste zal normaliseren (Barsanti, 2006).

## 5.6 Preventie

Zie preventie bij de hond.

## 6. Bespreking

Ondanks het feit dat wereldwijd uitbraken van aviaire botulisme regelmatig en uitgebreid optreden, komen caninen en felines botulisme maar sporadisch voor. Het risico hierin is dat botulisme kan vergeten worden in de differentiaaldiagnose wanneer een zieke hond of kat wordt aangeboden met als voornaamste symptoom een zwakte of paralyse van de achterste poten of van alle ledematen. Bovendien is het vaak zo dat het toedienen van niets meer dan een ondersteunende therapie (voldoende eten, drinken en beweging) toch heel snel verbetering geeft met een volledig herstel na reeds enkele dagen. Om deze reden wordt vaak niet verder niet gezocht naar de oorzaak waardoor botulisme vermoedelijk meer voorkomt dan wat de literatuur doet vermoeden.

Er zijn al heel wat specifieke behandelingen en preventieve maatregelen ontwikkeld die de infectie met of de gevolgen van botulisme tegengaan. Zo kunnen aangetaste paarden bijvoorbeeld behandeld worden met een antitoxine therapie (Gupta, 2007). Een ander voorbeeld is dat in Zuid-Afrika en Australië runderen en schapen jaarlijks gevaccineerd worden met een vaccin die toxoiden van *C. botulinum* type C en D bevat (Cornelisse, 1993). Het belang van deze vaccins is dat de economische gevolgen van botulisme bij deze dieren desastreus kunnen zijn, wat voor honden en katten niet zo is. Samen met het feit dat het voorkomen van caninen/felines botulisme zelden is en dat een ondersteunende therapie vaak voldoende is om een volledig herstel te bekomen, vormen deze gegevens een logische verklaring waarom op dit moment nog geen preventieve of therapeutische opties bestaan voor botulisme bij hond en kat. Het gebruik van het equine antitoxine bij kleine huisdieren is mogelijk maar omstreden. Eens de symptomen zich namelijk voordoen, heeft het gebruik van het antitoxine geen zin meer aangezien de neurotoxines zich dan al grotendeels in de neuronen bevinden. Het antitoxine biedt namelijk alleen bescherming ter hoogte van het bloed (Gupta, 2007).

Uit de literatuur blijkt dat wanneer botulisme bij honden gediagnosticeerd wordt, het vaak om jachthonden gaat. Ergens is dit logisch gezien zij frequenter dan de gemiddelde gezinshond op plaatsen komen waar eventueel kadavers van vogels met botulisme kunnen teruggevonden worden. Het gaat dan vooral over gebieden met stilstaand water, beekjes, riviertjes enz. Vooral voor deze honden zou een vaccin of een meer specifieke therapie tegen *C. botulinum* type C toch interessant kunnen zijn.

Aangezien botulisme een levensbedreigende aandoening is en er geen specifieke medicamenteuze opties bestaan, is preventie enorm belangrijk. Het is belangrijk dat men te allen tijde honden zoveel mogelijk probeert te weren van kadavers van vogels, vooral in de buurt van stilstaand water aangezien aviaire botulisme frequent bij watervogels voorkomt. Voor katten geldt hetzelfde maar is uiteraard veel moeilijker te controleren. Ook het voederen van rauw vlees moet men steeds vermijden. Het voedsel gedurende 30 min verwarmen op 80°C of gedurende 10 min op 100°C vernietigt het neurotoxine in het vlees.

## 7. Referentielijst

- Barsanti J.A. (2006). Infectious diseases of the Dog and Cat 3rd Edition, Elsevier, Philadelphia, chapter 42 p. 1-12
- Bruchim Y., Steinman A., Markovitz M., et al. (2006). Toxicological, bacteriological and serological diagnosis of botulism in a dog, *The Veterinary Record* 158, 768-769
- Cornelisse J.L. (1993). Bacteriële ziekten en mycotische aandoeningen bij dieren, Wetenschappelijke uitgeverij Bunge, Utrecht, p. 212-216
- Elad D., Yas-Natan E., Aroch I., Shamir M.H., Kleinbart S., Hadash D., Chaffer M., Greenberg K., Schlosberg A. (2004). Natural *Clostridium botulinum* type C toxicosis in a group of cats, *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5406-5408
- Gupta R.C. (2007). Veterinary toxicology basic and clinical principles, Academic Press, New York, p. 755-767
- Hirsh D.C., Maclachlan N.J., Walker R. (2004). Veterinary Microbiology, Blackwell Publishing, New Jersey, p. 209-211
- Krüger M., Neuhaus J., Herrenthey A.G., Mourat Gökce M., Schrödl W., Shehata A.A. (2014). Chronic botulism in a Saxony dairy farm: Sources, predisposing factors, development of the disease and treatment possibilities, *Anaerobe* 28, 220-225
- Montecucco C. (1986). How do Tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes?, *Trends in Biochemical Sciences* 11, 314-317
- Pantano S., Montecucco C. (2014). The blockade of the neurotransmitter release apparatus by botulinum neurotoxins, *Cellular and Molecular Life Sciences* 71, 793-811
- Pellizzari R., Rossetto O., Schiavo G., Montecucco C. (1999). Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses, The Royal Society, London, p. 259-268
- Popoff M.R., Bouvet P. (2013). Genetic characteristics of toxigenic *Clostridia* and gene evolution, *Toxicon* 75, 63-89
- Rocke T.E., Bollinger T.K. (2007). Infectious diseases of wild birds, Blackwell Publishing, Iowa, p. 377-383



Rocke T.E., Smith S.R., Nashold S.W. (1998). Preliminary evaluation of a simple in vitro test for the diagnosis of type C botulism in wild birds.

Rosetto O., Pirazzini M., Montecucco C. (2014). Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights, *Nature Review Microbiology* 12, 535-549

Schiavo G., Rossetto O., Santucci A., Dasgupta B.R., Montecucco C. (1992). Botulinum neurotoxins are zinc proteins, *The Journal of Biological Chemistry* 267, 23479-23483

Simpson L. (2013). The life history of a botulinum toxin molecule, *Toxicon* 68, 40-59

Smith G.R. (1976). Botulism in waterfowl, *WWT Waterfowl Journal* 27, 129-137

Tjalsma E.J. (1990). Drie gevallen van *Clostridium botulinum* type C intoxicatie bij de hond, *Tijdschrift voor diergeneeskunde* 115, 518-521

Trampel D.W., Smith S.R., Rocke T.E. (2005). Toxicoinfectious botulism in commercial caponized chickens, *Avian diseases* 49, 301-303

Uriate A., Thibaud J-L., Blot S. (2010). Botulism in 2 urban dogs, *The Canadian Veterinary Journal* 51, 1139-1142

Van Ham A., Vanhaesebrouck A., Polis I., Van Ham L. (2009). Megaoesophagus bij hond en kat, *Vlaams diergeneeskundig tijdschrift* 78, 388-399

