

## Surto de Botulismo Tipo C em Aves de Subsistência em Santa Catarina, Brasil

Outbreak of Type C Botulism in Backyard Poultry in Santa Catarina, Brazil

Lucas de Souza Quevedo<sup>1</sup>, Sara Elis Schmitt<sup>1</sup>, Jéssica Aline Withoeft<sup>1</sup>,  
Thierry Grima de Cristo<sup>1</sup>, Camila Aparecida Figueiredo<sup>2</sup>, Jordana Almeida Santana<sup>3</sup>,  
Rodrigo Otávio Silveira Silva<sup>3</sup> & Renata Assis Casagrande<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Background:** Botulism is a disease caused by the ingestion of neurotoxin produced by *Clostridium botulinum*, characterized by flaccid paralysis, which can lead to high mortality. They have seven types of neurotoxins (A, B, C, D, E, F, and G) and, in birds, most cases are attributed to type C. They are considered sources of botulinum toxins where the decomposition of organic matter occurs, like stagnant water and rotting food. The main feature of the disease in birds is ascending symmetric flaccid paralysis. The present study aims to describe an outbreak of type C botulism in backyard poultry in the state of Santa Catarina, Southern Brazil.

**Case:** A visit was made to the property with 160 backyard poultry with a history of high mortality in the municipality of Agrolândia, Santa Catarina. Clinical signs were characterized by paralysis of the pelvic limbs, neck and pendular wings, which progressed to death within 48 h. There was a mortality rate of 37.5% (60/160) between March and May 2019. These birds were kept in an overcrowded environment, with different species (chickens, ducks, teals, and turkeys) fed irregularly. The water supplied was provided from kitchen exhaust, accumulating in puddles on the floor that contained organic matter residues such as animal feces, food waste and bone fragments. The disposal of the carcasses of birds that died was in the same enclosure, buried superficially, facilitating the access of other birds to dig them up and consume them. Necropsy was performed on 2 chickens and one duck, no macroscopic or histopathological lesions were observed. Blood, liver, and gastrointestinal content samples were sent for research and identification of botulinum toxin through the serum neutralization test in mice. The presence of type C botulinum toxin was confirmed in the liver chicken of one sampled animals.

**Discussion:** The identification of type C botulinum toxin enabled the characterization of the outbreak, which is the toxin most associated with episodes of botulism in birds. It is not always possible to identify the origin of the infection, as intoxication can occur by ingestion of water contaminated with organic waste, however, in this outbreak, as sources of poisoning in birds, it was specified and occurred due to the ingestion of water with organic matter that was stagnant in the floor of the enclosure, and also by ingesting contaminated carcasses present in the area. In subsistence farming, botulism outbreaks are reported with greater frequency in the Northeast and Southeast of Brazil generally, cases in which sanitary conditions and incorrect carcass disposal favor the occurrence of the disease. As noted in the present study, high mortality is a common feature of botulism. The evaluated signs and developed evolution were similar to previous studies, which ranged from 14 to 72 h. The absence of macroscopic and histopathological changes is commonly reported in cases of botulism in domestic animals, since botulinum toxin only causes functional changes, with no tissue damage. The association of clinical signs, epidemiology, *post mortem* evaluation and detection of type C botulinum toxin concludes the diagnosis of botulism. Avian influenza and Newcastle disease are important diseases that have neurological conditions and high mortality that should be distinguished from botulism. This report confirms the need to associate history, clinical signs, absence of lesions with laboratory research for the diagnosis of botulism in birds. In addition, it reinforces the importance of disclosing basic management measures to prevent the occurrence of outbreaks such as presented in this report.

**Keywords:** *Clostridium botulinum*, neurotoxin, bird disease, paralysis.

**Descritores:** *Clostridium botulinum*, neurotoxina, doença de ave, paralisia.

DOI: 10.22456/1679-9216.118874

Received: 15 October 2021

Accepted: 30 December 2021

Published: 15 February 2022

<sup>1</sup>Laboratório de Patologia Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brazil.  
<sup>2</sup>Prefeitura do Município de Agrolândia, SC. <sup>3</sup>Laboratório de Anaeróbios, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil. CORRESPONDENCE: R.A. Casagrande [renata.casagrande@udesc.br].  
Av. Luiz de Camões n. 2090. CEP 88520-000 Lages, SC, Brazil.

## INTRODUÇÃO

As doenças que cursam com paralisia flácida são de extrema importância para animais [1,12,17]. Dentre estas doenças destaca-se o botulismo, causado pela ingestão de exotoxinas produzidas pelo *Clostridium botulinum* [26]. Sete neurotoxinas (A, B, C, D, E, F e G) são produzidas, baseada na especificidade antigênica da neurotoxina botulínica (BoNT) [32]. O botulismo é uma intoxicação alimentar de humanos, além de gerar preocupação devido a perdas econômicas para animais de produção [12,14,29].

São consideradas como fontes de toxinas botulínicas locais onde haja decomposição de matéria orgânica [1,2,21]. Após a ingestão da toxina botulínica, essa migração aos nervos terminais das placas neuromusculares, proporcionando uma falha na liberação de acetilcolina na fenda sináptica, levando a ausência de contração muscular e paralisia flácida [8,26].

O primeiro relato de botulismo no país em aves ocorreu em 1971 no estado do Rio de Janeiro [4]. Posteriormente, houve relatos em aves de subsistência nos estados do Espírito Santo, Rio Grande do Norte e Minas Gerais [1,21,27]. A característica principal da doença é a paralisia flácida, acometendo primeiramente membros pélvicos, asas, pescoço e pálpebras [33].

Apesar da importância do botulismo, ainda parece haver um desconhecimento acerca das medidas para prevenção dos casos, levando a surtos esporádicos de grande mortalidade. Este trabalho tem como objetivo descrever um surto de botulismo tipo C em aves de subsistência no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil.

## CASO

Realizou-se visita técnica a uma criação de aves de subsistência com histórico de alta mortalidade no município de Agrolândia, região do Alto Vale

do Itajaí, Santa Catarina. O plantel era composto por 160 aves domésticas das ordens Galliformes e Anseriformes, como galinhas (*Gallus domesticus*), patos (*Anas platyrhynchos*), marrecos (*Anas querquedula*) e perus (*Meleagris* sp.). Efetuou-se necropsia em 2 galinhas que morreram de forma natural e em 1 pato com sinais neurológicos que foi submetido a eutanásia. Todos os órgãos foram coletados, fixados em formalina tamponada a 10%, incluídos em blocos de parafina e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina<sup>1</sup>, para avaliação histopatológica.

Foram coletadas, ainda, amostras de sangue para obtenção do soro do pato e para realização do teste de soroneutralização em camundongo para detecção e identificação da toxina botulínica, fígado e conteúdo gastrointestinal do pato e de 1 das galinhas foram coletados e remetidos ao Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As aves eram mantidas em um ambiente em condições de superlotação, onde coabitavam diferentes espécies em idades variadas. A alimentação fornecida era composta por ração para as aves jovens, e milho para as adultas. No entanto, os animais eram alimentados com pouca frequência e não havia separação entre os comedouros, e, por este motivo, alimentavam-se do que encontravam no solo. O fornecimento de água às aves era proveniente do sistema de esgoto da cozinha da casa dos produtores (Figura 1A), que ficava acumulada em poças no recinto das aves, repleta de restos de matéria orgânica de diferentes origens, como fezes dos animais do local, restos de alimentos, fragmentos de ossos, frutas e vegetais. As aves que morriam eram enterradas superficialmente no próprio ambiente de convívio das demais e, por conta da restrição alimentar,



**Figura 1.** Surto de botulismo tipo C em aves de subsistência. A- Sistema de esgotamento de água que era ofertada às aves mantidas no recinto. B- Local onde eram desenterradas as aves mortas. C- Fragmentos ósseos e restos mortais de galinhas com livre acesso das outras aves no recinto.

eram desenterradas e consumidas por elas (Figura 1B). Foram visualizados, também, ossos compatíveis com a espécie bovina, além de ossos de aves espalhados pelo ambiente, repletos de fissuras que sugeriam bicagem constante (Figura 1C).

Houve acometimento de 37,5% (60/160) das aves, intermitente por 3 meses. Relatou-se que 2 aves da ordem Strigiforme e Columbiforme, ambas de vida livre, que haviam entrado no recinto das aves domésticas, também foram encontradas mortas. Os sinais clínicos compreendiam paralisia de membros pélvicos e pescoço, além de asas pendulares (Figura 2), que progrediam para morte em até 48 h.

Não foram observadas lesões macroscópicas e histopatológicas nas aves avaliadas, apenas ossos semi-macerados no proventrículo de 1 das galinhas. No fígado da galinha submetido ao teste de soroneutralização, foi detectada a toxina botulínica do tipo C.

## DISCUSSÃO

O diagnóstico presuntivo de botulismo foi baseado na associação de histórico, epidemiologia, sinais clínicos característicos e ausência de significativas alterações *post mortem*. Porém, a confirmação laboratorial é obtida pela detecção e tipificação da toxina botulínica pela soroneutralização em camundongos, a mais específica e sensível para detecção e tipificação [1,16,18]. Quando há suspeita clínica de botulismo, é de extrema importância a coleta de amostras de soro, conteúdo gastrointestinal, e tecido hepático durante a necropsia para realização do isolamento da toxina [19]. Após a ingestão da toxina botulínica, ocorre o deslocamento para o interior da célula de forma irreversível e, assim, uma grande parte da dose tóxica é removida da circulação, tornando mais difícil a sua detecção no soro ou nos tecidos [10,13].

Em aves, a toxina pode ser encontrada em altas concentrações no sangue, e desta forma o soro pode ser considerado ideal para isolar a toxina [18]. Cabe ressaltar que amostras de sangue, quando coletadas poucas horas após o início dos sinais clínicos, aumentam a sensibilidade do diagnóstico, e além disso, toxina botulínica também pode ser encontrada em tecido hepático macerado ou pelo conteúdo da moela e ingluvío [22,28]. Nesse surto, a toxina foi detectada apenas no tecido hepático da galinha, demonstrando a importância de realizar a coleta de múltiplos tecidos, aumentando as chances do isolamento.



Figura 2. Surto de botulismo tipo C em aves de subsistência: pato em decúbito dorsal com paralisia de membros pélvicos e asas.

Em bovinos, além da detecção da toxina em soro sanguíneo, também pode haver isolamento a partir de amostras de fígado, conteúdo ruminal e líquido intestinal [9]. Em equinos, o fígado também é considerado o órgão de eleição para a testagem através de bioensaios em camundongos [2]. Porém, independente da espécie, a detecção das toxinas botulínicas pode ser extremamente desafiadora, sendo muitas vezes detectada apenas em um pequeno número de animais, como visto por exemplo um surto em equinos no Rio Grande do Sul [2] ou em um surto recente e de grande amplitude em bovinos no Mato Grosso do Sul [11].

A toxina do tipo C, está associada aos casos de botulismo em aves [1,21,35]. No surto em questão, os animais apresentaram sinais clínicos e evolução semelhantes aos descritos em estudos anteriores, que variaram de 14 a 72 h [1,17,21]. A quantidade de toxina ingerida e a sensibilidade da espécie influencia na evolução dos quadros clínicos [35]. Apesar da reconhecida variação de sensibilidade à toxina botulínica apresentada entre espécies e em aves de diferentes idades [7], no presente estudo, todas as aves apresentaram período de incubação semelhante, culminando em morte, não sendo possível estimar quaisquer diferenças entre as espécies ou idades.

Em um surto ocorrido no estado de Minas Gerais, em perus de subsistência, 100% dos animais morreram [17], e em outro surto no Espírito Santo, a mortalidade chegou a 96% [1]. Em um surto ocorrido no Rio Grande do Norte, obteve-se o mesmo percentual de mortalidade do presente surto (37,5%) [21]. De acordo com estes trabalhos, constata-se que a alta mortalidade é uma característica comum do botulismo em aves domésticas, apesar que relato de mortalidade

inferior também ocorre, como observado em um surto em Minas Gerais, com mortalidade de 6,7% [28].

Deve-se considerar como diagnóstico diferencial de botulismo em aves a doença de Newcastle e a influenza aviária que também cursa com alta mortalidade, com sinais neurológicos graves caracterizados por incoordenação, tremor, paralisia das asas, movimentos em círculos e torcicolo, além de dificuldade respiratória seguida de morte. As aves podem apresentar lesões macroscópicas como hemorragias disseminadas e na histopatologia infiltrado de células mononucleares no sistema nervoso [6,20].

A ausência de alterações macroscópicas e histopatológicas é comumente relatada nos casos de botulismo em animais domésticos, uma vez que a toxina botulínica causa apenas alteração funcional, não ocorrendo lesões teciduais [1,2]. Alguns achados de necropsia podem ser indicativos de botulismo, como a presença de ossos, larvas de moscas ou restos de carcaças junto ao conteúdo gastrointestinal, como no presente estudo [5,19].

Nem sempre a fonte exata da intoxicação é encontrada [21,22,27], porém, a avaliação epidemiológica do recinto das presentes aves demonstrou achados consistentes com a epidemiologia do botulismo, como o acúmulo de matéria orgânica no recinto, água empocada de esgoto originado da cozinha para fornecimento aos animais, e o enterro de carcaças de aves em covas rasas no mesmo recinto, assim, possibilitando que as demais aves as desenterrassem e consumissem. O consumo de águas empocadas ricas em matéria orgânica, ou ainda, de larvas de muscídios presentes em carcaças de outras aves mortas, são frequentemente relatados como possíveis fontes de infecção [4,5].

Devido à ausência de vacinas comerciais disponíveis para aves no Brasil, é preconizado o controle por meio da prevenção, evitando o acesso dos animais às

possíveis fontes da toxina, como carcaças, material em decomposição, água estagnada, entre outros. Métodos como este são considerados eficazes no combate ao botulismo em criações de subsistência [17].

Os surtos de botulismo em aves de produção são relatados de forma esporádica [25,31], ademais, acredita-se que temperaturas acima de 24°C tenham um papel importante na ocorrência de botulismo [30,34]. Em animais silvestres, o botulismo causado pela toxina C ou D podem acontecer em animais de vida livre [3], no Brasil, há relato da doença nestes animais no semi-árido e no sul do país, 2 casos foram diagnosticados no Rio Grande do Sul em aves selvagens de cativeiro [15,23].

Na região Sul do país, apenas 1 caso de botulismo causado pela toxina C em galinhas foi relatado no Rio Grande do Sul, no município de Santa Maria [24], e no estado de Santa Catarina ainda não tinha sido relatado a ocorrência de botulismo em aves de criações de subsistência. Este parece ser o primeiro relato de botulismo causado pela toxina C em criação de aves de subsistência no estado de Santa Catarina. Os fatores compostos por deficiência nutricional, sanitária e descarte incorreto de carcaças contribuíram para a ocorrência do surto, alertando para a necessidade da manutenção de boas condições sanitárias nos recintos, o que possibilita a prevenção de futuros surtos e perdas de plantéis de subsistência.

#### MANUFACTURER

<sup>1</sup>Labsynth Produtos para Laboratório Ltda. Diadema, SP, Brazil.

**Funding.** This work was supported by Programa de Apoio à Pós-Graduação maintained by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROAP/CAPES, Finance code 001).

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

#### REFERENCES

- 1 **Alves G.G., Silva R.O.S., Pires P.S., Salvarani F.M., Oliveira Jr. C.A., Souza G.X.W., Santos F.C.M., Caldas R.P., Assis R.A. & Lobato F.C.F. 2013.** Surto de botulismo tipo C em frangos na cidade de Pancas, Espírito Santo, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*. 34(1): 355-358.
- 2 **Argenta F.F., Konradt G., Bassuino D.M., Caprioli R.A., Laisse C.J.M., Borsanelli A.C., Dutra I.S. & Driemeier D. 2017.** Surto de botulismo tipo C em equinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 37(12): 1369-1372.
- 3 **Badagliacca P., Pomilio F., Auricchio B., Sperandii A.F., Di Provvido A., Di Ventura M., Migliorati G., Caudullo M., Morelli D. & Anniballi F. 2018.** Type C/D botulism in the waterfowl in an urban park in Italy. *Anaerobe*. 54: 72-74.

- 4 Brada W., Langenegger J. & Langenegger C.H. 1971. Botulismo aves no Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 6: 27-32.
- 5 Coelho H.E., Gomes A.L., Nunes T.C., Alberto H. & Medeiros A.A. 2007. Botulismo em aves domésticas - *Gallus gallus domesticus* relato de caso. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. 10(2): 125-128.
- 6 Desingu P.A., Singh S.D., Dhama K., Vinodhkumar O.R., Barathidasan R., Malik Y.S., Singh R. & Singh R.K. 2016. Molecular characterization, isolation, pathology and pathotyping of peafowl (*Pavo cristatus*) origin Newcastle disease virus isolates recovered from disease outbreaks in three states of India. *Avian Pathology*. 45(6): 674-682.
- 7 Dohms, J.E. & Cloud S.S. 1982. Susceptibility of broiler chickens to *Clostridium botulinum* type C toxin. *American Association of Avian Pathologists*. 26(1): 89-96.
- 8 Dolly J.O., Black J., Williams R.S. & Melling J. 1984. Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and meiate its internalization. *Nature*. 307: 457-460.
- 9 Dutra I.S., Döbereiner J., Rosa I. V., Souza L.A.A. & Nonato M. 2001. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 21(2): 43-48.
- 10 Gross W.B. & Smith L.D. 1971. Botulism in gallinaceous birds. *Avian Diseases*. 15(4): 716-722.
- 11 Guizelini C.C., Lemos R.A.A., Paula J.L.P., Pupin R.C., Gomes D.C., Barros C.S.L., Neves D.A., Alcântara L.O.B., Silva R.O.S., Lobato F.C.F. & Martins T.B. 2019. Type C botulism outbreak in feedlot cattle fed contaminated corn silage. *Anaerobe*. 55: 103-106.
- 12 Hoque M.A., Skerratt L.F., Rahman M.A., Beg A.B.M.R.A. & Debnath N.C. 2010. Factors limiting traditional household duck production in Bangladesh. *Tropical Animal Health and Production*. 42(7): 1579-1587.
- 13 Jeffrey J.S., Meteyer C.U., Rezvani M., Galey F.D. & Kinde H. 1994. Type C botulism in turkeys: Determination of the median toxic dose. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 6(1): 93-95.
- 14 Leclair D., Fung J., Isaac-Renton J.L., Proulx J.F., May-Hadford J., Ellis A., Ashton E., Bekal S., Farber J.M., Blanchfield B. & Austin J.W. 2013. Foodborne botulism in Canada, 1985-2005. *Emerging Infectious Diseases*. 19(6): 961-968.
- 15 Lima P.C., Dutra I.S., Araújo F.A.A., Lustosa R., Zeppelini C.G. & Franke C.R. 2020. First record of mass wild waterfowl mortality due to *Clostridium botulinum* in Brazilian semiarid. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 92(1): 1-13.
- 16 Lindström M. & Korkeala H. 2006. Laboratory diagnostics of botulism. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(1): 298-314.
- 17 Lobato F.C.F., Salvarani F.M., Silva R.O.S., Assis R.A., Lago L.A., Carvalho Filho M.B. & Martins N.R.S. 2009. Type C botulism in turkeys in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*. 39(1): 272-274.
- 18 Lobato F.C.F., Salvarani F.M., Silva R.O.S., Martins N.R.S., Souza A.M., Carvalho Filho M.B., Nascimento R.A.P. & Assis R.A. 2008. Type C botulism in a goose at Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*. 38(4): 1179-1180.
- 19 Maréchal C.L., Woudstra C. & Fach P. 2016. Botulism. In: Uzal F.A., Songer J.G., Prescott J.F. & Popoff M.R. (Eds). *Clostridial Diseases of Animals*. Hoboken: John Wiley & Sons, pp.303-330.
- 20 Molini U., Aikukutu G., Roux J.P., Kemper J., Ntahonshikira C., Marruchella G., Khaibeb S., Cattoli G. & Dundon W.G. 2020. Avian influenza H5N8 outbreak in African penguins (*Spheniscus demersus*), Namibia, 2019. *Journal of Wildlife Diseases*. 56(1): 214-218.
- 21 Olinda R.G., Gois R.C.S., Silva R.O.S., Caldas R.P., Lobato F.C.F. & Batista J.S. 2015. Surto de botulismo tipo C em aves domésticas no semiárido do Nordeste, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 22(3-4): 157-159.
- 22 Pigatto C.P., Schocken-Iturrino R.P., Chioda T.P., Garcia G.R., Vittori J. & Berchielli S.C.P. 2007. Intoxicação natural por *Clostridium botulinum* tipo "C" em grupo de aves domésticas. *Archives of Veterinary Science*. 12(2): 13-16.
- 23 Raymundo D.L. 2010. Estudo comparativo das clostridioses diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande. 72f. Porto Alegre, RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 24 Saraiva D. 1978. Botulismo animal no Rio Grande do Sul: botulismo por tipo C em galinhas. *Revista Centro de Ciências Rurais*. 8(2): 153-159.
- 25 Sato Y., Wigle W.L., Gallagher S., Johnson A.L., Sweeney R.W. & Wakenell P.S. 2016. Outbreak of type C botulism in commercial layer chickens. *Avian Diseases*. 60(1): 90-94.

- 26 Schiavo G., Matteoli M. & Montecucco C. 2000. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiological Reviews*. 80(2): 717-766.
- 27 Silva R.O.S., Martins R.A., Assis R.A., Oliveira Júnior C.A. & Lobato F.C.F. 2018. Type C botulism in domestic chickens, dogs and black-pencilled marmoset (*Callithrix penicillata*) in Minas Gerais, Brazil. *Anaerobe*. 51: 47-49.
- 28 Silva R.O.S., Oliveira C.A., Gonçalves L.A. & Lobato F.C.F. 2016. Botulismo em ruminantes no Brasil. *Ciência Rural*. 46(8): 1411-1417.
- 29 Soares M.C., Gaspar A.O., Brumatti R.C., Gomes D.C., Neves D.A., Alcântara L.O.B., Leal P. V. & Lemos R.A.A. 2018. Economic impact of an outbreak of botulism in a cattle feedlot. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 38(7): 1365-1370.
- 30 Son K., Kim Y.K., Woo C., Wang S.J., Kim Y., Oem J.K., Jheong W. & Jeong J. 2018. Minimizing an outbreak of avian botulism (*Clostridium botulinum* type C) in incheon, South Korea. *Journal of Veterinary Medical Science*. 80(3): 553-556.
- 31 Souillard R., Maréchal C.L., Ballan V., Rouxel S., Léon D., Balaine L., Poëzevara T., Houard E., Robineau B., Robinault C., Chemaly M. & Bouquin S.L. 2017. Investigation of a type C/D botulism outbreak in free-range laying hens in France. *Avian Pathology*. 46(2): 195-201.
- 32 Swaminathan S. 2011. Molecular structures and functional relationships in clostridial neurotoxins. *FEBS Journal*. 278(23): 4467-4485.
- 33 Trampel D.W., Smith S.R. & Rocke T.E. 2005. Toxicoinfectious botulism in commercial caponized chickens. *Avian Diseases*. 49(2): 301-303.
- 34 Vidal D., Anza I., Taggart M.A., Pérez-ramírez E., Crespo E., Hofle U. & Mateo R. 2013. Environmental factors influencing the prevalence of a *Clostridium botulinum* type C/D mosaic strain in nonpermanent Mediterranean wetlands. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(14): 4264-4271.
- 35 Wobeser G. 1997. Avian Botulism - another perspective. *Journal of Wildlife Diseases*. 33(2): 181-186.