

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA  
TIPO C E D EM BOVINO - RELATO DE CASO

A.F.C. Nassar, S. Miyashiro, G. Daniel, S.F. Souza, F. Peraçoli

Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: nassar@biologico.sp.gov.br

## RESUMO

O presente trabalho descreve um quadro de botulismo em bovino fêmea proveniente do Município de São José dos Campos, SP, que apresentou no pós-parto um quadro de paralisia flácida de membros posteriores seguida de óbito, em propriedade de criação extensiva de corte. Foi possível detectar a toxina botulínica tipos C e D a partir dos conteúdos ruminal e intestinal pela técnica de soroneutralização em camundongo. Surto de botulismo em bovinos são frequentes no Brasil, geralmente devido ao hábito de osteofagia, que leva à ingestão de toxina produzida pelo bacilo anaeróbio *Clostridium botulinum*. A falta de suplementação mineral pode ser um fator desencadeador do quadro de botulismo, aliado a ausência de um manejo adequado.

PALAVRAS-CHAVE: *Clostridium botulinum*, botulismo, bovino.

## ABSTRACT

IDENTIFICATION OF BOTULINIC TOXIN TYPE C AND D IN A BOVINE - CASE REPORT. The present study reports a case of botulism in a female bovine from São José dos Campos, state of São Paulo, Brazil, that presented flaccid paralysis after calving and died, on a property of extensive beef production. It was possible to detect botulinic toxin types C and D from the ruminal and intestinal contents through mouse seroneutralization assay. Cases of bovine botulism are frequent in Brazil, usually associated with the ingestion of carcasses as a result of pica in phosphorus deficient areas, which leads to the ingestion of the toxin produced by the anaerobic bacilli *Clostridium botulinum*. The lack of mineral supplementation can be a trigger for cases of botulism, together with the absence of adequate management.

KEY WORDS: *Clostridium botulinum*, botulism, bovine.

O botulismo é uma doença frequente no país causada pelas toxinas classificadas de A a G, que são antigenicamente distintas produzidas pelo *Clostridium botulinum*, sendo que a intoxicação em bovinos é mais comumente causada pelas toxinas C e D, embora haja relatos de casos de botulismo em bovinos no Brasil por toxinas tipo A e B (SCHOKEN-ITURRINO *et al.*, 1990; LOBATO *et al.*, 1988).

*C. botulinum* é um bacilo anaeróbio, Gram-positivo, formador de esporos que o torna extremamente resistente possibilitando sua sobrevivência e sua disseminação por longos períodos nos mais diversos ambientes, proliferando em matéria vegetal e cadáveres que entram em decomposição no pasto, água estagnada, feno, milho, silagem, casca de soja peletizada, ração e principalmente por cama de frango. Este última tem seu uso proibido no Brasil pela Instrução Normativa nº 15 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como uma das medidas preventivas para se evitar no país os

riscos potenciais da Encefalopatia Esporgiforme Bovina (BSE), mas sabe-se que ainda é utilizada na suplementação alimentar de bovinos, principalmente pela dificuldade de fiscalização e inexpressivas ações de educação sanitária (BIENVENU *et al.*, 1990; BRASIL, 2001; DUTRA *et al.*, 2005). Dessa maneira ainda tem sido relatada como maior fonte de infecção para animais confinados nos últimos anos, em função da presença de restos de aves, nos quais produz uma neurotoxina que, quando ingerida, causa doença (SCHOKEN-ITURRINO, 1990; JONES, 1991).

Além da falta de manejo sanitário, a contribuição mais comum para os animais contraírem a doença consiste no manejo nutricional incompleto, com falta de suplementação mineral de qualidade acarretando em deficiência de fósforo (TOKARNIA *et al.*, 1970), levando os animais a desenvolver perversão de apetite passando a ingerir e roer ossos dos cadáveres deixados no pasto, além de comer também restos de tendões e músculos, onde estão presentes as toxinas e também

esporos, estabelecendo assim a cadeia epidemiológica do botulismo a campo (LANGENEGGER; DÖBEREINER, 1988). DUTRA; DÖBEREINER (1995) relataram que surtos têm sido registrados em extensas regiões do país acometendo principalmente fêmeas em gestação ou em lactação, com estimativa de centenas e milhares de mortes. Os animais afetados tornam-se prostrados e têm dificuldade para se manter em decúbito esternal, porém a consciência é mantida até o final do quadro, quando o animal entra em coma e morre (RISTIC; MCINTIRE, 1981). Quando ingerida e absorvida, as toxinas ligam-se a receptores no Sistema Nervoso Periférico, bloqueando a liberação da Acetilcolina, que atua como mediadora do impulso nervoso, determinando assim um quadro de paralisia flácida (CARTER; CHENGAPPA, 1991).

O diagnóstico dessa intoxicação é baseado na detecção da toxina botulínica nos conteúdos gástrico e intestinal, hemossoro e fígado do animal morto ou doente ou quando possível do alimento suspeito (HUHTANEN, 1979).

Foi investigado o material de um bovino do sexo feminino de 5 anos, recém-parida que apresentou quadro de paralisia flácida de membros posteriores e morte, ocorrido na região de São José dos Campos, SP, em propriedade de criação extensiva de corte. Dois meses antes foi relatada a morte de 10 animais com a mesma sintomatologia, sendo que na propriedade não há suplementação mineral adequada e vacinas contra botulismo não eram aplicadas.

As amostras de conteúdo ruminal e intestinal do animal acometido foram trituradas e diluídas em tampão gelatina fosfatada (pH 6,2) na proporção de 1:2 (peso/volume). Após um período de 12 a 18 horas mantidas em refrigeração a 4° C, as amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 8.000 x g por 8 minutos a 8° C. Foram retiradas duas alíquotas de 1 mL do sobrenadante, a primeira sendo tratada com tripsina (0,2%) e outra alíquota sem tripsina. Após 30 minutos de incubação a 37° C, as amostras foram inoculadas em camundongos albinos pesando entre 18 a 20 g, na dose de 0,5 mL por via intraperitoneal. Os animais foram observados por um período de 96 horas (BALDASSI *et al.*, 1991). Para confirmação e tipificação da toxina, o material suspeito foi primeiramente aquecido a 100° C para inativação das toxinas, pois elas são termolábeis, e inoculados 0,5 mL em camundongos. Outra alíquota do material foi tratada com as antitoxinas C na dosagem 458 UI/mL e com a toxina D na dosagem 10 UI/mL, e realizada a soroneutralização e inoculação em camundongo para tipificação da toxina botulínica, reinoculando novos camundongos na mesma dosagem.

Em 24 horas após a inoculação, os camundongos inoculados com e sem tripsina apresentaram ericizar de pêlos, fezes aderentes ao orifício anal, perda do tônus

muscular bem evidente em abdome e, em seguida, morte levando a suspeita de diagnóstico de botulismo.

Após o choque térmico e o tratamento das amostras com as antitoxinas C e D, os camundongos não foram a óbito após as 96 horas de observação, confirmando a inativação da toxina pelo aquecimento a 100° C e pelas antitoxinas C e D.

O botulismo no Brasil é conhecido como “doença da vaca caída”, afeta bovinos leiteiros e de corte, causando maiores perdas no gado de corte, acometendo principalmente animais criados em sistema extensivo. Isso pode ser explicado pela deficiência de fósforo nas pastagens formadas, bem como pela contaminação da água com restos de cadáveres que são lançados nela (TOKARNIA *et al.*, 1970; DUTRA; DÖBEREINER, 1995).

A confirmação da toxina botulínica é realizada pela técnica de soroneutralização e inoculação em camundongo preconizada pelo “Center for Disease Control” (CDC) por ser uma técnica sensível, de alta confiabilidade e apresentar grande especificidade (SMITH, 1977; BALDASSI, *et al.*, 1991).

Segundo JONES (1991), a determinação da toxina em conteúdo ruminal e ou intestinal fornece evidências circunstanciais para o diagnóstico definitivo de botulismo, enquanto que no fígado a toxina, quando encontrada, pode ter sido produzida somente no quadro final da doença ou no *post-mortem*, o que não pode servir como critério para diagnóstico.

HEIDER *et al.* (2001) reportaram um caso de diagnóstico presuntivo de botulismo pela toxina tipo D em cinco bovinos no Canadá. O diagnóstico utilizado foi por meio dos sintomas clínicos associados ao isolamento do agente do conteúdo ruminal. Segundo TRUEMAN *et al.* (1992), o *C. botulinum* pode ser encontrado na microbiota normal do animal, porém é muito difícil encontrar o bacilo no conteúdo ruminal de animais sadios, dessa maneira HEIDER *et al.* (2001) procederam o diagnóstico presuntivo de botulismo causado pela toxina tipo D.

O presente relato confirma a presença de toxina botulínica do tipo C e D em bovino fêmea, por meio da técnica de soroneutralização e inoculação em camundongo, causado pelas toxinas tipo C e D. O não fornecimento de suplementação mineral aos animais criados em sistemas extensivos, principalmente em vacas recém-paridas que necessitam de uma suplementação adequada, pode ter favorecido a depravação do apetite já que no pasto onde esses animais permaneciam havia presença de ossos e restos de cadáveres, considerado importante fator de risco para a ocorrência da doença. Portanto, para o controle do botulismo nos rebanhos, pode-se adotar três medidas principais: eliminação da fonte de contaminação, suplementação adequada com fósforo aliado à vacinação do rebanho, já que a prevenção é a melhor forma para combater a doença, e garantir a sanidade do rebanho.

## REFERÊNCIAS

- BALDASSI, L.; HIPOLITO, M.; PORTUGAL, M.A.S.C.; CALIL, E.M.B.; MOULIN, A.A.P.; PIRES, D.C. Botulismo bovino: comprovação laboratorial do diagnóstico clínico, período 1986-1989. *Revista de Saúde Pública*, v.25, n.5, p.371-374, 1991.
- BIENVENU, J.G.; MORIN, M.; FORGET, S. Poultry litter associated botulism (type C) in cattle. *Canadian Veterinary Journal*, v.31, n.10, p.111, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Proibir a importação de ruminantes, embriões e produtos derivados destas espécies, quando procedentes e/ou originários de países que registraram casos autóctones da encefalopatia espongiiforme bovina. Instrução normativa nº 15 de 17 de julho de 2001. Diário Oficial, n.138, Seção 1, de 18.07.2001. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>>. Acesso em: 25 jul. 2009.
- CARTER, G.R.; GHENGAPPA, M.M. Clostridia. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). *Essential of veterinary bacteriology and mycology*. 4th.ed. London: Lea & Febiger, 1991. 284p., Chap.14.
- DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J. Fatos e teorias sobre a doença da vaca caída: botulismo. *A Hora Veterinária*, v.84, p.7-10, 1995.
- DUTRA, I.S.; DÖBEREINERLL, J.; SOUZA, A.M. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama-de-frango. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, n.2, p. 115-119, 2005.
- HEIDER, L.C.; McCLURE, J.T.; LEGER, E.R. Presumptive diagnosis of *Clostridium botulinum* type D intoxication in a herd of feedlot cattle. *Canadian Veterinary Journal*, v.42, p.210-212, 2001.
- HUHTANEN, C.M. Bile acid inhibition of *Clostridium botulinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.38, p.216, 1979.
- JONES, T.O. Bovine botulism. *In Practice*, v.13, n.3, p.84-86, 1991.
- LANGENEGGER, J.; DÖBEREINER, F. Botulismo enzoótico em búfalos no Maranhão. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.8, n.1/2, p.37-42, 1988.
- LOBATO, F.C.F.; MELO, M.A.; SILVA, W.; DINIZ, J.M. Botulismo causado pelo *Clostridium botulinum* tipo B. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.40, n.6, p.445-446, 1988.
- RISTIC, M.; McINTYRE, I. *Diseases of cattle in the tropics*. The Hague: Martinus Nijhoff, 1981. 662p.
- SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; AVILA, F.A.; BERCHIELLI, S.C.P.; NADER FILHO, A. First case of type A botulism in zebu (*Bos indicus*). *Veterinary Record*, v.126, n.9, p.217-218, 1990.
- SMITH, L.D.S. Botulismo: el microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Zaragoza: Acribia, 1977. 241p.
- TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H.; CARVALHO, E.V. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.5, p.465-472, 1970.
- TRUEMAN, K.F.; BOCK, R.E.; THOMAS, R.J.; TAYLOR, J.D.; GREEN, P.A.; ROEGER, H.M.; KETTERER, P.J. Suspected botulism in three intensively managed Australian cattle herds. *Veterinary Records*, v.130, p.398-400, 1992.

Recebido em 7/8/07

Aceito em 6/8/09