

BOTULISMO EXPERIMENTAL EM CAPRINOS PELA TOXINA TIPO C¹

LILIAN B. SANTOS², JOSÉ R. MINEO², DEISE A. OLIVEIRA SILVA², MARIA A. SOUZA², HUMBERTO E. COELHO³, ERNESTO A. TAKETOMI², ANDRÉ L.M. CARDOSO² e MARCO A. METIDIERI²

ABSTRACT.- Santos L.B., Mineo J.R., Silva D.A.O., Souza M.A., Coelho H.E., Taketomi E.A., Cardoso A.L.M. & Metidieri M.A. 1993. [Experimental type C botulism in goats.] Botulismo experimental em caprinos pela toxina tipo C. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(3/4):73-76. Laboratório de Imunologia, Depto Patologia, Univ. Fed. Uberlândia, C.P. 593, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil.

The present paper describes the subcutaneous inoculation of goats with botulinum toxin type C to determine the doses required to cause various clinical signs, and to evaluate the bioassay as a means of laboratory confirmation of the diagnosis of botulism. Serial double dilutions in doses ranging from 15.6 to 500 DL50/kg were administered to 6 goats. The animals were checked daily to observe development of characteristic signs. Blood and liver samples were collected to detect the toxin by bioassay in mice. Doses of 500 and 250 DL50/kg induced acute botulism, death occurring between 42 and 46 hours post-inoculation, but the toxin was only detected in serum samples taken from the goat which received the larger dose. Animals inoculated with doses of 125, 62.5 and 31.3 DL50/kg developed the sub-acute form, but the toxin could not be detected in their blood serum. The chronic form of botulism was observed in those which received 15.6 DL50/kg doses and the toxin could not be demonstrated either in their serum samples. The results confirm that goats are highly susceptible to botulinum type C toxin and that these animals develop the same clinical signs as seen in bovines.

INDEX TERMS: Experimental botulism, goats, botulinum type C toxin, clinical signs, bioassay in mice.

SINOPSE.- O objetivo do presente trabalho foi reproduzir o botulismo em caprinos, induzido pela toxina tipo C e determinar as doses para desenvolver as diferentes formas clínicas, bem como para avaliar a eficácia do bioensaio em camundongos. Foram utilizados 6 caprinos, inoculados por via subcutânea com a toxina tipo C, em doses de 500 a 15,6 DL50/kg de peso vivo, em diluições duplas seriadas. Os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de sintomatologia característica de botulismo e amostras de soro sanguíneo e fígado foram coletadas para pesquisa da toxina pelo bioensaio em camundongos. As doses de 500 e 250 DL50/kg induziram quadro agudo de botulismo evoluindo para a morte entre 42 e 46 horas pós-inoculação. A toxina foi detectada somente no soro do animal que recebeu a dose de 500 DL50/kg. Os animais que receberam as doses de 125, 62,5 e 31,3 DL50/kg desenvolveram quadro subagudo da doença, não sendo detectado a toxina nas amostras analisadas. Observou-se quadro crônico de botulismo no animal inoculado com a dose de 15,6 DL50/kg, não se constatando a presença da toxina no soro. Os resultados confirmaram a alta susceptibilidade dos caprinos à toxina botulínica tipo C, que apresentaram quadros clínicos semelhantes aos observados em bovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Botulismo experimental, caprinos, toxina botulínica tipo C, formas clínicas, diagnóstico laboratorial pelo bioensaio.

INTRODUÇÃO

Botulismo é uma enfermidade neuroparalítica causada pela ação de toxinas produzidas por *Clostridium botulinum*. Este microrganismo, sob a forma de esporos, é encontrado no solo, água e na matéria orgânica de origem animal e vegetal.

As toxinas botulínicas são classificadas em 8 tipos serologicamente distintos: A, B, C₁, C₂, D, E, F e G (Sugiyama 1980), embora possuam ações farmacológicas semelhantes. Atuam por meio de bloqueio da liberação de acetilcolina nas terminações neuro-motoras, impedindo a transmissão dos impulsos nervosos, o que resulta em um quadro de paralisia flácida.

As toxinas tipos C e D têm sido descritas nos casos de botulismo em ruminantes, particularmente na Austrália, África do Sul e Senegal (Theiler et al. 1927, Simmons & Tammemagi 1964, Doutre & Chambron 1966), onde foram observadas altas mortalidades em bovinos com quadro clínico de botulismo epizootico.

No Brasil, a doença em bovinos foi primeiramente diagnosticada no Estado do Piauí (Tokarnia et al. 1970) e mais tarde assinalada em Goiás (Moreira et al. 1980) e no Rio Grande do Sul (Turnes et al. 1984). No decorrer dos

¹ Aceito para publicação em 11 de fevereiro de 1993.

² Laboratório de Imunologia, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Uberlândia, Caixa Postal 593, Uberlândia, MG 38400-902.

³ Departamento de Medicina Animal, Univ. Fed. Uberlândia.

anos, o botulismo na sua forma epizootica assumiu grande importância para a pecuária no País, principalmente na região Centro-Oeste (Döbereiner et al. 1992). Nesses relatos a doença deveu-se à ingestão de ossos e restos de cadáveres abandonados nos pastos, nos quais havia condições de anaerobiose favoráveis à proliferação de *Clostridium botulinum* e produção da toxina. A osteofagia está associada à deficiência de fósforo nas pastagens, bem como à falta de suplementação adequada deste mineral aos bovinos.

Em caprinos, não se têm descrito casos espontâneos de botulismo, embora esta espécie seja susceptível à ação da toxina C, que é geralmente o tipo responsável pelo botulismo associado à ingestão de forragens contaminadas (Smith 1977).

Fjoistad (1973) em trabalho experimental em caprinos, através da administração oral de toxina botulínica tipo C beta determinou que doses de 500 a 1.000 MMLD/kg (minimum mouse lethal dose) de peso vivo são capazes de provocar sintomas e morte por botulismo nesta espécie.

O presente trabalho teve como objetivos: (1) estabelecer as doses de toxina botulínica tipo C, em DL₅₀/kg de peso vivo, necessárias para produzir sintomatologia e/ou morte em caprinos quando inoculadas por via subcutânea; (2) determinar as diferentes formas clínicas do botulismo, correlacionando-as com os quadros observados em bovinos; (3) avaliar o diagnóstico laboratorial de bioensaio pela detecção da toxina em amostras de soro e fígado dos animais inoculados.

MATERIAL E MÉTODOS

Toxina

A amostra de toxina botulínica tipo C utilizada foi gentilmente cedida pelo Laboratório Vallée Nordeste S/A (Montes Claros, MG), consistindo de filtrados de culturas de *Clostridium botulinum* tipo C, sob condições estritas de anaerobiose (Wright 1933). A potência do filtrado foi determinada através de inoculação e camundongos (Notermans et al. 1982), calculando-se a DL₅₀ pelo método de Reed & Muench (1938).

A potência da toxina botulínica tipo C utilizada no experimento foi calculada em 10.000 DL₅₀/ml, determinada após inoculação intraperitoneal em camundongos.

Tipificação da toxina botulínica

Para a confirmação do tipo da toxina botulínica utilizada foi realizado o teste de soroneutralização em camundongos, de acordo com as normas recomendadas pelo Center for Disease Control (CDC), Atlanta, Georgia, USA. As antitoxinas botulínicas monovalentes tipos A, B, C, D e E (1 UI), procedentes do Instituto Pasteur (Paris), foram misturadas à toxina, na proporção de 1:2 e inoculadas em 2 camundongos, por via intraperitoneal, num volume de 0,5 ml, após prévia incubação por 30 minutos a 37°C em banho-maria. Os animais foram observados durante 4 dias e considerou-se o teste positivo quando os animais sobreviviam até o final do período de observação.

A toxina foi comprovada como sendo do tipo C, através do teste de soroneutralização em camundongos, pela não neutralização com as antitoxinas botulínicas monovalentes tipos A, B, D e E, ocorrendo a neutralização somente com a antitoxina tipo C.

Animais

Foram utilizados 6 caprinos mestiços, machos, com peso entre 22 e 57,5 kg, cedidos pelo Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos em baias individuais. Durante o período foram feitas mensurações diárias da ingestão de água e alimento (capim *camerum* picado).

A toxina botulínica tipo C foi inoculada, por via subcutânea, em diluições duplas seriadas a partir da dose de 500 DL₅₀/kg de peso vivo, como é demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1. Esquema da inoculação de caprinos, por via subcutânea, com a toxina botulínica tipo C

Caprino	Peso (kg)	Volume (ml)	Dose	
			DL ₅₀ /kg	DL ₅₀ /total
1	57,5	2,87	500	28.750
2	22,0	0,55	250	5.500
3	45,0	0,56	125	5.625
4	31,2	0,20	62,5	1.950
5	29,0	0,10	31,3	906
6	34,0	0,05	15,6	531

Avaliação clínica

Os animais foram observados, diariamente, quanto ao desenvolvimento de sintomatologia característica de botulismo. Determinaram-se as diferentes formas clínicas (superaguda, aguda, subaguda e crônica), em função do tempo decorrido desde o início dos sintomas até à morte do animal. Paralelamente, foram registrados parâmetros clínicos relativos à frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, temperatura e mucosas visíveis.

Avaliação laboratorial

Foram realizadas colheitas de sangue, prévia e periodicamente após a inoculação, sendo que nos primeiros 2 dias, as sangrias foram feitas a cada 12 horas e nos dias posteriores, a cada 24 horas, objetivando-se a detecção da toxina no soro, através de bioensaio em camundongos, segundo as normas recomendadas pelo CDC.

Nos casos de morte, foram realizadas necropsias, registrando-se os achados anátomo-patológicos. Foram coletadas amostras de fígado, baço, cérebro, cerebelo e linfonodos mesentéricos para exames histopatológicos, sendo que as amostras de fígado também foram analisadas pelo bioensaio em camundongos, para pesquisa da toxina botulínica.

RESULTADOS

Avaliação clínica

Como demonstrado no Quadro 2, os Caprinos 1 e 2, inoculados com as doses de 500 e 250 DL₅₀/kg, respectivamente, desenvolveram quadros agudos de botulismo, com início dos sintomas após 26 horas (Capr. 1) e 30 horas (Capr. 2) da inoculação. Foram observados anorexia, adipsia, incoordenação motora progressiva, permanecendo os animais em decúbito esterno-abdominal, paralisia da língua com exteriorização espontânea, sialorréia, paralisia dos músculos torácicos evidenciada por respiração fortemente abdominal, evoluindo para a morte após 42 horas (Capr. 1) e 46 horas (Capr. 2) da inoculação (Fig. 1).

Quadro 2. Resultados da avaliação clínica e laboratorial dos caprinos inoculados, por via subcutânea, com a toxina botulínica tipo C

Caprino	Dose DL ₅₀ /kg	Detecção da toxina		Sobrevivida (horas)	Quadro clínico de botulismo
		Soro	Fígado		
1	500	+	-	42	Agudo
2	250	-	-	46	Agudo
3	125	-	-	76	Subagudo
4	62,5	-	-	94	Subagudo
5	31,3	-	-	140	Subagudo
6	15,6	-	NR ^a	Não letal	Crônico

^aNR = não realizado.



Fig. 1. Caprino 2 inoculado com 250 DL₅₀/kg da toxina botulínica tipo C, após 38 horas de inoculação (quadro agudo).

Nos Caprinos 3, 4 e 5, inoculados, respectivamente com 125, 62,5 e 31,3 DL₅₀/kg, observou-se sintomatologia característica de botulismo semelhante à descrita anteriormente, porém com diferentes períodos de incubação: 41 horas (Capr. 3) e 72 horas (Capr. 4 e 5). Os sintomas evoluíram de forma gradativa até à morte, que ocorreu às 76 horas (Capr. 3), 94 horas (Capr. 4) e 140 horas (Capr. 5) pós-inoculação, caracterizando quadro subagudo da doença nos três casos.

O Caprino 6, que recebeu 15,6 DL₅₀/kg, desenvolveu quadro crônico de botulismo, com início dos sintomas após 96 horas da inoculação. O animal mostrou-se apático, diminuindo a ingestão de alimento e água a aproximadamente 1/3 da quantidade normal, ficando longos períodos em decúbito esternal, com dificuldade para se levantar e ligeira incoordenação motora. Este quadro perdurou por cerca de 4 semanas evoluindo para a recuperação do animal, porém com redução de 25 a 30% do seu peso.

Os parâmetros clínicos relativos à frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, temperatura e mucosas visíveis, não apresentaram alterações relevantes.

Avaliação laboratorial

A presença da toxina botulínica só foi constatada no soro sanguíneo do Caprino 1, inoculado com 500

DL₅₀/kg, em amostra colhida às 18 horas, não sendo mais detectada nas amostras de soro colhidas subsequentemente às 30 e 42 horas pós-inoculação. Nas amostras de soro dos caprinos 2, 3, 4, 5 e 6 bem como nas amostras de fígado dos animais necropsiados (Capr. 1, 2, 3, 4, 5) não foi confirmada a presença da toxina botulínica, pelo bioensaio em camundongos (Quadro 2).

Os achados de necropsia não revelaram lesões específicas e ao exame histopatológico, observaram-se hemorragias perivasculares e edema cerebral, mais acentuados nos Caprinos 3, 4 e 5.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os caprinos apresentam alta susceptibilidade à toxina botulínica tipo C, embora não se tenham relatos da ocorrência de botulismo natural nesta espécie (Smith 1977).

Em trabalho experimental, utilizando a toxina botulínica tipo C β , por via oral, Fjølstad (1973) determinou as doses capazes de induzir sintomatologia e morte por botulismo em caprinos estabelecendo que 1 MMLD corresponde a 1,2 - 1,3 DL₅₀. Desta forma, a dose letal de 500 MMLD/kg correlaciona-se aproximadamente a 650 DL₅₀/kg. Observou ainda que o tipo de alimento pode ter alguma influência sobre a evolução e a letalidade do botulismo em caprinos uma vez que os animais tratados com pastagens ou silagens toleravam doses maiores de toxina que aqueles alimentados com feno.

Simmons & Tammemagi (1964) demonstraram em botulismo bovino experimental pela toxina tipo D, que a via oral requer uma quantidade de toxina significativamente maior que a via parenteral (subcutânea), para produzir quadros clínicos de botulismo correspondentes. Em trabalho de botulismo experimental realizado em bovinos com a toxina botulínica tipo D, por via subcutânea, foi observado que a dose mínima para causar sintomas e/ou morte estaria entre 500 e 350 DL₅₀/kg (Cardoso et al., dados não publicados).

Neste experimento, foi utilizado a unidade DL₅₀/kg para melhor definir a quantidade de toxina botulínica (determinada pela toxicidade em camundongos) necessária para causar sintomatologia e/ou morte em caprinos. Desta forma, a grande variação do peso corporal dos animais em experimentação (22 a 57,5 kg) não influenciou a evolução e letalidade da doença, uma vez que as doses de toxina foram administradas em função do peso vivo de cada animal e não em termos de volume.

Assim, utilizando-se doses de toxina botulínica tipo C de 500 a 15,6 DL₅₀/kg, em diluições duplas seriadas, foram observadas as formas clínicas gradativas da doença: aguda, subaguda e crônica. Por conseguinte, foi estabelecido a dose mínima letal (31,3 DL₅₀/kg) necessária para induzir quadro subagudo de botulismo em caprinos.

As formas clínicas aguda e subaguda não mostraram diferenças significativas entre si quanto aos sintomas apresentados pelos animais inoculados, porém observaram-se variações no período de incubação e tempo de evolução dos sintomas até a morte, que apresentaram uma

relação inversa com a dose inoculada. Estes sintomas foram semelhantes aos observados em caprinos por Fjølstad (1973) bem como em bovinos por Simmons & Tammemagi (1964).

O quadro crônico apresentado pelo caprino 6 muito se assemelhou à forma clínica correspondente em bovinos (Simmons & Tammemagi 1964), enfatizando-se a anorexia e adipsia como sintomas precoces e predominantes, resultando em considerável perda de peso.

O diagnóstico laboratorial só pôde ser confirmado em um dos casos agudos, pela detecção da toxina somente no soro do animal que recebeu a dose mais alta de toxina C (500 DL₅₀/kg) e apenas na primeira amostra analisada às 18 horas pós-inoculação. Estes dados são concordantes com os relatos de Simmons & Tammemagi (1964) e Cardoso et al. (dados não publicados) que evidenciaram a presença da toxina no soro de bovinos como forma superaguda de botulismo experimental, detectada pelo bioensaio em camundongos. Nos demais casos agudo, subagudo e crônico, a presença da toxina não pôde ser comprovada, provavelmente em virtude das menores doses inoculadas. A toxina não foi constatada em amostras de fígado dos animais necropsiados, coletadas e processadas imediatamente após a morte dos mesmos. Os relatos de Fjølstad (1973) sobre botulismo experimental em caprinos demonstraram a presença da toxina C beta em amostras de fígado somente quando coletadas após 20 horas da morte. Isto sugere que a toxina encontrada no fígado pode ter sido um evento *post-mortem*, pela migração de bactérias do trato gastrintestinal ao fígado, portanto, sem valor para o diagnóstico.

A ausência de lesões específicas nos achados de necropsia e a presença de hemorragias perivasculares e edema cerebral também foram observados em botulismo bovino, relatados por Pamukcu (1954), Simmons & Tammemagi (1964), e Blood et al. (1988).

Os resultados do presente trabalho confirmaram a extrema susceptibilidade dos caprinos à toxina botulínica tipo C, apresentando quadros clínicos de botulismo muito semelhantes aos observados em bovinos. A dificuldade do diagnóstico da doença, através da detecção da toxina

em amostras de soro e fígado pelo bioensaio em camundongos, também é verificada nesta espécie, a não ser nos quadros superagudos, quando doses suficientes de toxina estão presentes nas amostras analisadas.

Agradecimentos.- Os autores agradecem ao Dr. Gabriel A. Pereira Filho, do Laboratório Valée Nordeste S/A, pelo fornecimento da toxina utilizada no experimento.

REFERÊNCIAS

- Blood D.C., Henderson J.A. & Radostits O.M. 1988. Doenças causadas por Bactérias. II. Botulismo. Clínica Veterinária. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 428-430.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H., Langenegger J. & Dutra I.S. 1992. Epizootic Botulism of cattle in Brazil. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 99(5):188-190.
- Doutre M.P. & Chambron J. 1966. Le botulisme des ruminants et des équidés au Sénégal. Caractères de la souche isolée de *Clostridium botulinum* et de sa toxine. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 19:495-519.
- Fjølstad M. 1973. The effects of clostridium toxin type C β given orally to goats. Acta Vet. Scand. 14:69-80.
- Moreira E.C., Lima J.D. & Leite R.C. 1980. Botulismo no sul de Goiás e Marajó. Anais 17º Congr. Bras. Med. Vet., Fortaleza, p. 24. (Resumo)
- Notermans S., Dufrenne J. & Kozaki S. 1982. The relation between toxicity and toxin-related antigen contents of *Clostridium botulinum* types C and D cultures as determined by mouse bioassay and ELISA. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 35:203-211.
- Pamukcu A.M. 1954. Hemorrhagic encephalomyelitis due to botulism in cattle in Turkey. Zentrbl. Vet. Med. 1:707-722.
- Reed L.J. & Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497.
- Simmons G.C. & Tammemagi L. 1964. *Clostridium botulinum* type D as a cause of bovine botulism in Queensland. Aust. Vet. J. 40:123-127.
- Smith L.D. 1977. Botulismo, p. 82-127. El microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Ed. Acirbia, Zaragoza (España).
- Sugiyama H. 1980. *Clostridium botulinum* neurotoxin. Microbiol. Rev. 44(3):419-448.
- Theiler A., Viljoen P.R., Green H.H., Du Toit P.J., Meier H. & Robinson E.M. 1927. Lamsiekte (parabotulism) in cattle in South Africa. Rep. Dir. Vet. Educ. Res., South Africa, 11/12:821-1361.
- Tokarnia C.H., Langenegger J., Langenegger C.H. & Carvalho E.V. 1970. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. Pesq. Agropec. Bras. 5:465-472.
- Turnes C.G., Langenegger J. & Scarsi R.M. 1984. "Mal do Alegrete": evidências de *Clostridium botulinum* D como agente etiológico. Anais 19º Congr. Bras. Med. Vet., Belém, p. 138.
- Wright H.D. 1933. The importance of adequate reduction of peptone in the preparation of media for pneumococcus and other organisms. J. Path. Bact., Edinburgh, 37:257.