

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV**  
**DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E PATOLOGIA**  
**MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**LUCIANE ORBEM VERONEZI**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E**  
**LABORATORIAIS DO BOTULISMO EM BOVINOS NO ESTADO DE**  
**SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada à Coordenação do  
Curso de Mestrado em Ciência Animal, como  
requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Sandra Davi Traverso  
Co-orientador: Dr. Aldo Gava

**LAGES, SC**

**2009**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região  
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Luciane Orbem Veronezi

Aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos e laboratoriais  
do botulismo em bovinos no estado de Santa Catarina. / Luciane  
Orbem Veronezi. -- Lages, 2009.  
95 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências  
Agroveterinárias / UDESC.

1. Botulismo. 2. Bovino. 3. Toxina botulínica. I. Título.

CDD – 636.08969315

**LUCIANE ORBEM VERONEZI**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E  
LABORATORIAIS DO BOTULISMO EM BOVINOS NO ESTADO DE  
SANTA CATARINA**

Dissertação aprovada pela Coordenação do Curso de Mestrado em Ciência Animal, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**Banca examinadora:**

Orientadora:

\_\_\_\_\_  
Prof. <sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Davi Traverso  
Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV. Universidade do Estado  
de Santa Catarina – UDESC.

Co-orientador:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Aldo Gava  
Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV. Universidade do Estado  
de Santa Catarina – UDESC.

**Membros:**

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Maria Antonio Hübinger  
Tokarnia  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro – UFRRJ - Instituto de Zootecnia.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra  
Universidade Estadual Paulista, Faculdade  
de Odontologia e Curso de Medicina  
Veterinária, São Paulo – UNESP.

**Lages, 11 de Novembro de 2009**

## DEDICO

*À Deus e a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que mais essa etapa de minha profissionalização e crescimento pessoal se concretizassem.*

*À minha mãe Laura Orbem Veronezi, ao meu pai Egeu Veronezi, aos meus irmãos Patricia e Egeu Augusto por terem me dado o apoio que precisei para realizar mais um sonho.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, primeiramente pelo dom da existência, pelos que a geraram e por todos que me cercaram de cuidados, amor e carinho no decorrer destes anos. Agradeço-lhe PAI, pela força que me impulsionou a chegar até aqui e poder realizar mais um sonho.

À minha família, em especial à minha mãe, meu maior exemplo a seguir por sua conduta e grandes princípios. Ao meu pai que sempre apoiou as minhas escolhas, e que tem trabalhado muito para proporcionar um futuro melhor para mim e meus irmãos, sendo um modelo a ser seguido. Aos meus irmãos, pessoas que admiro pela inteligência e coragem.

Aos meus padrinhos Izaléia e Lourenir, pessoas muito especiais, que me deram muita força, me ajudando sempre, os quais tenho grande admiração e respeito.

À professora Dra. Sandra Davi Traverso, minha orientadora, pelos ensinamentos, pela orientação, pela amizade aqui consolidada, pela ajuda e pelo apoio nos momentos mais difíceis, assim como nos momentos mais felizes desta etapa concluída. À Professora Sandra muito, muito, muito obrigada por tudo de coração!!!

Ao Professor Dr. Aldo Gava, pela orientação e co-orientação, por despertar em mim o interesse pela patologia e pelas plantas tóxicas, pelos sábios ensinamentos, pela amizade e apoio durante todos os momentos, tanto nos felizes assim como nos mais difíceis desta caminhada.

À Universidade do Estado de Santa Catarina e em especial ao Setor de Patologia Animal, pelo ambiente familiar e caloroso acolhimento, durante todos esses anos.

Aos professores, mestrandos, técnicos, bolsistas e estagiários do Laboratório de Patologia Animal, pela convivência, amizade e a grande ajuda.

Ao Professor Dr. Iveraldo dos Santos Dutra e a técnica Rosa Maria Moraes Ferreira, pelo auxílio na interpretação do exame microbiológico, pelos ensinamentos e pelo carinho e atenção com que fui acolhida na passagem pelo Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais da UNESP - Campus Araçatuba.

Às amigas e irmãs Vanessa Borelli, Patrícia Giovana Hoepers e Daniela Lentz, pela eterna amizade, pelo companheirismo e pela ajuda na realização dos projetos e nos momentos de dificuldades que enfrentamos juntas nesta etapa completada.

Às amigas do coração Joelma Lucioli, Michelle de Paula Gabardo, Fernanda Jönck e Renata Casagrande pela grande amizade, pela convivência diária e pelo auxílio nas atividades laboratoriais. Em especial quero agradecer a maninha Michelle de Paula Gabardo pelo carinhoso acolhimento em sua casa durante o término da dissertação.

À minha amigona Ana Lúcia Silva Ribeiro pelo apoio, carinho e auxílio desde a época de graduação até o presente momento, que mesmo estando longe se encontra sempre presente.

Não poderia esquecer os amigos do Laboratório: Fernando Henrique Furlan, Alencar Dante Zandonai, Marcos Bruno Mazzoco, Valdecir Nunes, Diego Lacir Froelich, Romoaldo Frizon e Marcelo Pedroti de César pelo companheirismo, amizade e convivência nestes anos que passamos juntos.

À Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CAV, ao Programa de Monitoria (PROMOP), pela concessão de bolsa de capacitação para realização deste trabalho.

**À TODOS MUITO OBRIGADA!!!**

*“Você não pode provar uma definição. O que você pode fazer é mostrar que ela faz sentido.”*

**Albert Einstein**

*“Mesmo que já tenhas feito uma longa caminhada, há sempre um caminho a fazer.”*

**Santo Agostinho**

## RESUMO

O trabalho foi realizado através de estudo dos aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos e laboratoriais do botulismo em bovinos no Estado de Santa Catarina, durante os anos de 1987 a 2008. Os dados foram adquiridos através de informações obtidas dos arquivos do Setor de Patologia Animal CAV/UDESC e nas propriedades em que a enfermidade continuou a ocorrer. Nas propriedades com botulismo associado à deficiência de fósforo, os bovinos eram mantidos em campos nativos, na maioria dos casos, localizados na região do Planalto Serrano. A doença manifestou-se principalmente nos meses de verão, em vacas com terneiro ao pé, sem suplementação mineral e que não eram vacinados contra botulismo. Nas propriedades visitadas foram observados inúmeros ossos de cadáveres espalhados nas pastagens. Oito surtos de botulismo foram acompanhados no período de 2006 a 2008, sendo sete deles relacionados à carência de fósforo e osteofagia e um associado à pastagem de aveia adubada com compostagem incompleta de carcaças de suínos e aves. Em todos os surtos os sinais clínicos consistiam em paresia, paralisia progressiva, decúbito seguido de morte. Á necropsia não foram evidenciadas lesões, porém fragmentos de ossos foram encontrados misturados ao conteúdo do retículo de dois bovinos. No exame histológico não foi observado lesões significativas. Na análise microbiológica das amostras coletadas de sete surtos foi isolado *C. botulinum*. No botulismo associado a deficiência de fósforo foi detectada toxina botulínica tipo C em conteúdo intestinal de um bovino e tipo D a partir de ossos e amostras de solo coletado. No botulismo associado a alimentos contaminados, foi detectados esporos do *Clostridium botulinum* tipo D nas amostras da compostagem, de solo e ossos das carcaças espalhadas na pastagem. O diagnóstico de botulismo foi estabelecido através da análise dos aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos associado à detecção da toxina botulínica presente nos surtos acompanhados.

**Palavras-chave:** Botulismo. Bovinos. Toxina botulínica.



## ABSTRACT

The study was carried out through the epidemiological, clinical, pathological and laboratory findings of botulism in cattle in the state of Santa Catarina, during the period from 1987 to 2008. The data were obtained through information from the files of the Department of Animal Pathology CAV/UDESC and in the properties which the disease continued to occur. In properties with the botulism associated phosphorus deficiency cattle, the animals were kept on native pastures, in most cases, located in the Planalto Serrano. The disease occurred mainly in the summer months, when cows with calf without mineral supplementation and that were not vaccinated against botulism. In the farms visited, there were several bones of corpses scattered in the pastures. Eight outbreaks of botulism were studied from 2006 to 2008, including seven cases related to phosphorus deficiency and osteophagia, and one case associated with oat pasture fertilized with incomplete decomposed carcasses of pigs and poultry. In all outbreaks clinical signs consisted of paresis, progressive paralysis and recumbency followed by death. At necropsy there were no lesions, but bone fragments were found mixed with the contents of the reticulum of two cattle. On histological examination, significant lesions were not observed. In the microbiological analysis performed in the samples collected from seven outbreaks *C. botulinum* was isolated. In the botulism associated phosphorus deficiency, botulinum toxin type C was detected from the intestinal contents of cattle and type D on samples collected from bone and soil. In the botulism associated with contaminated feed, was detected spores of *C. botulinum* type D isolated from samples of compost, soil and bones of carcasses scattered in the pasture. The diagnosis of botulism was established through the analysis of epidemiological, clinical and pathological findings associated with the detection of toxin present in outbreaks studied

**Keywords:** Botulism. Bovine. Botulinum toxin.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Frequência dos sinais clínicos, em ordem decrescente, registrados nos históricos dos casos de botulismo arquivados no Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC durante o período de 1987 a 2008.....	47
Tabela 02 -	Frequência dos achados de necropsia em casos de botulismo registrados no Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC, durante o período de 1987 a 2008.....	48
Tabela 03 -	Coeficientes de mortalidade, morbidade e letalidade referentes aos surtos acompanhados de 2006 a 2008 pelo Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC.....	62
Tabela 04 -	Resultados do teste de bioensaio em camundongo dos materiais coletados nos surtos acompanhados durante os anos de 2006 e 2008 pelo Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC.....	63
Tabela 05 -	Resultados do teste de soroneutralização em camundongo para tipificação da toxina botulínica dos materiais coletados nos surtos acompanhados durante os anos de 2006 e 2008 pelo Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC.....	64
Tabela 06 -	Resultados do teste de soroneutralização em camundongo, após diluições, para tipificação da toxina botulínica dos materiais coletados nos surtos acompanhados durante os anos de 2006 e 2008 pelo Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC.....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Mapa de Santa Catarina ilustrando os municípios onde ocorreram casos de botulismo em bovinos registrados nos arquivos do Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC, no período compreendido entre 1987 a 2008.....	42
Figura 02 -	Mapa do Planalto Serrano Catarinense, com destaque para o município de Lages. No canto inferior esquerdo da figura, mapa de Santa Catarina destacando a região do Planalto Catarinense.....	43
Figura 03 -	Gráfico dos casos de botulismo registrados nos arquivos do Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC, no período compreendido entre 1987 a 2008, com comparativo entre número de animais doentes e número de animais necropsiados.....	44
Figura 04 -	Variação sazonal da ocorrência de botulismo no Estado de Santa Catarina registrada no Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC, no período compreendido entre 1987 a 2008.....	45
Figura 05 -	Classificação dos surtos de botulismo no Estado de Santa Catarina registrados no Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC, no período compreendido entre 1987 a 2008.....	46
Figura 06 -	A e B - Rebanho de bovino de corte nos campos nativos do Planalto Serrano Catarinense.....	49
Figura 07 -	Propriedades no município de Lages, SC. A - Cocho de madeira coberto utilizado para o fornecimento de sal mineral aos bovinos, com desproporção entre tamanho de cocho e número de animais. B e C - Cochos de madeira descobertos utilizados para o fornecimento de sal mineral.....	50
Figura 08 -	Propriedades do Planalto Serrano Catarinense: A e B - Carcaças de bovinos em diferentes estágios de decomposição. C - Ossos espalhados pelas propriedades.....	51
Figura 09 -	A e B – Bovinos com osteofagia em campos nativos, Planalto Serrano Catarinense.....	52

Figura 10 -	Bovino de corte, fêmea, adulta com botulismo. Animal em decúbito esternal, com incapacidade de retrain a língua após tracionada.....	53
Figura 11 -	Bovina, fêmea, com botulismo. A - Animal em decúbito esternal, cabeça voltada para o flanco esquerdo, exposição da língua após tração. B - Fragmento ósseo no retículo (círculo).....	55
Figura 12 -	Pastagem de aveia usada na alimentação de bovinos leiteiros, onde foi espalhado compostagem incompleta de carcaças de suínos e aves. No detalhe restos ósseos na pastagem. Eral Velho, Oeste Catarinense.....	58
Figura 13 -	Pastagem de aveia contaminada com carcaças de suínos e aves em estado incompleto de decomposição. A – Carcaça de suíno. B – Carcaça de frango..	59
Figura 14 -	Vacas leiteiras com botulismo. A – Animais adultos em decúbito esternal, com incapacidade de levantar. B – Bovino com paralisia flácida de membros posteriores e cabeça voltada para o flanco esquerdo.....	60
Figura 15 -	Carcaça em decomposição. Área de coleta de solo e ossos da carcaça para cultivo microbiológico, Lages, SC.....	62
Figura 16 -	Camundongos submetidos ao teste de bioensaio e soroneutralização. A – Camundongo com o acinturamento do abdômen. B – Paralisia flácida dos membros posteriores.....	65
Figura 17 -	Formas evolutivas do <i>C. botulinum</i> . No detalhe, bastonetes (seta) de <i>C. botulinum</i> com esporos subterminais e livres (ponta de seta). (Coloração de Gram, objetiva 100x).....	65

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 <i>Clostridium botulinum</i> : ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS.....	16
2.1.1 Características microbiológicas.....	16
2.1.2 Neurotoxinas botulínicas.....	20
2.1.2.1 Estruturas.....	20
2.1.2.2 Mecanismo de ação.....	21
2.2 INTOXICAÇÃO BOTULÍNICA EM BOVINOS: EPIDEMIOLOGIA, ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS.....	23
2.2.1 Epidemiologia do botulismo em bovinos.....	23
2.2.1.1 Botulismo associado à carência de fósforo.....	24
2.2.1.2 Botulismo associado a alimentos e água contaminados.....	27
2.2.2 Quadro clínico-patológico do botulismo em bovinos.....	28
2.2.3 Diagnóstico clínico e laboratorial do botulismo em bovinos.....	30
2.2.4 Diagnóstico diferencial.....	33
2.2.5 Tratamento e controle do botulismo em bovinos.....	33
2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO BOTULISMO EM BOVINOS NO BRASIL.....	34
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO.....	38
4.2 ACOMPANHAMENTO DE CASOS CLÍNICOS.....	39

4.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	39
4.3.1 Exame histológico.....	39
4.3.2. Exame microbiológico.....	39
4.3.2.1 Exame direto.....	40
4.3.2.2 Exame indireto.....	40
4.3.3 Bioensaio em camundongo.....	40
4.3.4 Soroneutralização em camundongo.....	41
 <b>5 RESULTADOS OBTIDOS.....</b>	 <b>42</b>
5.1 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO.....	42
5.1.1 Número de municípios com diagnóstico de botulismo em bovinos.....	42
5.1.2 Número de casos diagnosticados.....	43
5.1.3 Época do ano.....	44
5.1.4 Categoria de animais envolvidos.....	45
5.1.5 Distribuição quanto à fonte de intoxicação botulínica.....	45
5.1.6 Sinais clínicos.....	46
5.1.7 Lesões macroscópicas e histológicas.....	47
5.1.8 Visitas às propriedades rurais.....	48
5.1.8.1 Caracterização da propriedade.....	48
5.2. ACOMPANHAMENTO DE CASOS CLÍNICOS DE BOTULISMO.....	52
5.2.1 Surtos acompanhados no período de 2006 a 2008.....	53
5.2.1.1 Primeiro Surto.....	53
5.2.1.2 Segundo Surto.....	54
5.2.1.3 Terceiro Surto.....	54
5.2.1.4 Quarto Surto.....	56
5.2.1.5 Quinto Surto.....	56
5.2.1.6 Sexto Surto.....	57
5.2.1.7 Sétimo Surto.....	57
5.2.1.8 Oitavo Surto.....	60
5.2.2 Coeficientes de mortalidade, morbidade e letalidade.....	61
5.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	63
5.3.1 Exame histológico.....	63
5.3.2. Exame microbiológico.....	63
 <b>6 DISCUSSÃO.....</b>	 <b>66</b>
 <b>7 CONCLUSÃO.....</b>	 <b>74</b>
 <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	 <b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Estado de Santa Catarina, a população bovina é em torno de 3.488.992 cabeças (IBGE, 2007) e estima-se que a mortalidade anual seja de 7%. Essas perdas representariam aproximadamente 245.000 bovinos mortos anualmente e um grande prejuízo econômico. Em um estudo retrospectivo dos anos de 2000 a 2008, de 3822 exames de bovinos realizados pelo Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC, as doenças infecciosas foram responsáveis por 17,71% (677/3822) da causa *mortis* dos animais, sendo as doenças causadas pelo gênero *Clostridium* responsáveis por 13,14% (89/677) delas. Dentre estas, o botulismo apresentou a maior incidência correspondendo a 39,33% (35/89) dos casos analisados.

O botulismo em bovinos é uma doença de importância econômica e sanitária, sendo uma das principais causas de morte em animais no Brasil. A doença é causada pela ingestão da toxina tipo C ou D produzida pelo *Clostridium botulinum* e geralmente está relacionada à deficiência de fósforo associada à osteofagia, e a ingestão de alimentos ou água contaminados pela toxina botulínica.

A doença provoca um quadro clínico-patológico caracterizado por paralisia flácida progressiva, decúbito e morte por parada respiratória, com ausência de lesões macroscópicas e histológicas primárias associadas à doença. O diagnóstico presuntivo é baseado na epidemiologia e no quadro clínico apresentado pelo animal. A comprovação laboratorial é feita por meio de testes laboratoriais a partir de amostras coletadas de animais suspeitos (fígado, conteúdo ruminal e intestinal).

Em Santa Catarina, o primeiro diagnóstico de botulismo foi realizado no ano de 1983, através de dados epidemiológicos e sinais clínicos, no Município de Lages, na região da Coxilha Rica. Antes de 1983 a doença era rotineiramente diagnosticada como raiva. O número reduzido de médicos veterinários bem como o desconhecimento da doença e da sua relação com a deficiência de fósforo contribuiu para o não diagnóstico da mesma. A partir de 1983, com a criação do Laboratório de Patologia Animal - CAV/UDESC, a doença começou a ser diagnosticada na região, mas sem o conhecimento das toxinas envolvidas nos casos.

Diante do exposto, o presente trabalho visa, por meio de levantamento epidemiológico e acompanhamento de casos clínicos, traçar um panorama do botulismo no Estado de Santa

Catarina, descrevendo a epidemiologia, quadro clínico-patológico da doença, além da detecção das toxinas envolvidas nos casos clínicos acompanhados.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Clostridium botulinum*: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS

#### 2.1.1 Características microbiológicas

*Clostridium botulinum* é um microorganismo pertencente à família *Bacillaceae* e ao gênero *Clostridium*, que compreende um grupo de bactérias essencialmente anaeróbias e putrefativas (BLOBEL & SCHLIESSER, 1990; KRIEK & ODENDAAL, 1994; HATHEWAY & FERREIRA, 1996). É um bastonete gram positivo, móvel, com flagelos peritríquios, medindo 0,15-2,4 por 3,0-2,2 micrômetro, formador de esporos e produtor de toxinas. Desenvolve-se em pH entre 7,0-7,6 e em temperaturas variando entre 25 a 37 °C. O esporo é bastante resistente, entretanto pode ser destruído na temperatura de 121 °C por 15 minutos (SMITH, 1977; KRIEK & ODENDAAL, 1994; HATHEWAY & FERREIRA, 1996).

A distribuição e habitat naturais do *C. botulinum* variam amplamente, tendo uma localização cosmopolita (MEYER & DUBOVSKY, 1922a; MEYER & DUBOVSKY, 1922b; MEYER & DUBOVSKY, 1922c; TOKARNIA et al., 1970a; SMITH, 1977). Seu desenvolvimento pode ocorrer tanto em substrato animal como vegetal em decomposição (KRIEK & ODENDAAL, 1994), além de poder ser encontrado como habitante obrigatório ou mesmo como integrante da microbiota digestiva normal de vários mamíferos e aves (SMITH, 1977).

A toxina é responsável por produzir um quadro geralmente fatal, não febril, denominado de Botulismo, que é caracterizado por paresia e paralisia flácida nos músculos da locomoção, mastigação e deglutição (SMITH & SUGIYAMA, 1988; KRIEK & ODENDAAL, 1994). A doença ocorre em várias espécies animais, como: bovinos (THEILER, 1920; THEILER & ROBINSON, 1927; ROBINSON, 1930; HENNING, 1956; CALVET et al., 1965; TOKARNIA et al., 1970a; TURNES, LANGENEGGER & SCARSI, 1984; LANGENEGGER, SCARSI & MARTINS, 1984; DIVERS et al., 1986; GIBSON, 1986; LANGENEGGER, DÖBEREINER & TOKARNIA, 1983; MCLOUGHLIN,

MCILROY & NEIL, 1988; DÖBEREINER et al., 1992; DUTRA, WEISS & DÖBEREINER, 1992; DUTRA & DÖBEREINER, 1995; LOBATO et al., 1995; LISBOA et al., 1996; DUTRA, 2001; DUTRA et al., 2001; DUTRA, SOUZA & DÖBEREINER, 2001; DUTRA, DÖBEREINER & SOUZA, 2005; LOBATO et al., 2008), ovinos e caprinos (THEILER, 1927), eqüinos (ROBINSON, 1930; SWERCZEK, 1980a; SWERCZEK, 1980b; MACKAY & BERKHOFF, 1982; HAAGSMA et al., 1990), asininos, muares (ROBINSON, 1930) e, mais raramente, em suínos (BEIERS & SIMMONS, 1967). Humanos (VAN ERMENGEM, 1897; GIMÉNEZ & CICCARELLI, 1976; FRANCIOSA et al., 1999; GELLI, JAKABI & SOUZA, 2002; CARDOSO et al., 2004; KEET & STROBER, 2005; CERESER et al., 2006) e outras espécies animais como cães (BARSANT et al., 1978; DEZFULIAN & BARTLETT, 1984; WALLACE & MCDOWELL, 1986), martas, aves domésticas e silvestres (SMITH, OLIPHANT & EVANS, 1983), animais de laboratório e algumas espécies de peixes são susceptíveis a desenvolverem a doença (SMITH & SUGIYAMA, 1988).

Van Ermengem (1897), em 1895, isolou pela primeira vez o microorganismo durante intoxicação alimentar em humanos, a partir de presunto cru. Na ocasião o agente foi denominado *Bacillus botulinum* (latim “*butulus*” = salsicha). Nas duas décadas seguintes foi descoberto que existiam diferentes cepas de *C. botulinum* e, inclusive, outras espécies de *Clostrídios* (*C. butyricum* e *C. baratti*) que produziam tipos diferentes de toxinas (CARRUTHERS, 2002).

A primeira teoria de que um agente anaeróbio estivesse associado à causa do botulismo, foi proposta por Kerner em 1817 (MOORE & NAUMANN, 2003), observando que os alimentos responsáveis pela intoxicação em humanos, eram embutidos envoltos por estômago e intestino grosso e que, os casos mais frequentes, ocorriam em embutidos fervidos ou fígado defumado, levando-se a conclusão de que se tratava de um microorganismo termorresistente (SMITH, 1977). Posteriormente este agente foi cultivado e denominado por Van Ermengem, em 1897.

Burke em 1919 foi o primeiro a reconhecer os diferentes tipos de *C. botulinum*, designando-os por tipo A e tipo B.

Em 1922, Bengston, isolou e identificou o *C. botulinum* tipo C alfa (também denominada de cepa de Bengston), a partir de larvas de moscas, em cadáveres de frango que haviam morrido com paralisia. No mesmo ano, Seddon, identificou o tipo C beta (também conhecida como cepa de Seddon), a partir de ossos de bovinos mortos por paralisia bulbar, denominando-o de *Bacillus parobotulinum* (SEDDON, 1922). Estudos posteriores

evidenciaram que os diferentes tipos de *C. botulinum* tipo C formam um grupo complexo e heterogêneo, diferindo da classificação inicial proposta por Bengston (1922).

O *C. botulinum* tipo D foi identificado, em cadáveres de bovinos mortos por “Lamsiekte” (doença paralisante) (THEILER & ROBINSON, 1927) e o *C. botulinum* tipo E, foi verificado após o estudo de duas cepas de pescado, uma isoladas por Bier em 1936 e outra por Hazen, em 1937. A cepa tipo F, foi isolada de um surto de botulismo, a partir de amostra de pasta de fígado embutida, de preparo caseiro (MOLLER & SCHEIBEL, 1960). O *C. botulinum* tipo G foi identificado em amostras de solo na Argentina (GIMÉNEZ & CICCARELLI, 1970), sendo posteriormente associado a intoxicações naturais em seres humanos (GIMÉNEZ & CICCARELLI, 1976) e mais tarde denominada de *C. argentinense* (SUEN et al., 1988).

Atualmente são conhecidos sete tipos de *Clostridium botulinum*: A, B, C (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>), D, E, F e G, sendo todos diferenciáveis por meio de provas sorológicas específicas (SUGYIAMA, 1980; SILVA et al., 1991; SANTOS et al., 1993; KRIEK & ODENDAAL, 1994).

Há uma grande variação entre as cepas de *C. botulinum*, surgindo vários esquemas de classificação. Estes esquemas empregam diversos parâmetros como: os baseados em propriedades de cultivo, em produção de lipase, na estabilidade de esporos, nos produtos metabólicos finais, na atividade proteolítica, na temperatura de crescimento, nos antígenos de membrana e na homologia dos ácidos nucleicos (HATHEWAY & FERREIRA, 1996).

As características culturais e antigênicas permitem dividir os diversos tipos de *C. botulinum* em quatro grupos sendo tal classificação baseada na homologia de cada grupo e na uniformidade dos produtos proteolíticos das cepas (SMITH, 1977).

O primeiro grupo compreende todas as amostras do tipo A e todas as amostras proteolíticas dos tipos B e F. O segundo grupo inclui as amostras do tipo E e amostras não proteolíticas do tipo B e F. O terceiro grupo contém todas as amostras dos tipos C e D (SMITH & HOLDEMAN, 1968; SMITH & HOBBS, 1974; SMITH, 1977; HOBBS et al., 1982). O quarto grupo corresponde às amostras do *C. botulinum* tipo G (SMITH, 1977; HATHEWAY, 1995), que foi renomeado de *C. argentinense*, devido suas diferenças culturais e metabólicas (KRIEK & ODENDAAL, 1994).

O *C. botulinum* é encontrado ubiquitariamente sob a forma de esporos, no solo, na água e no trato digestivo de diferentes espécies animais (TOKARNIA et al., 1970b; SMITH, 1977; DUTRA et al., 1993; KRIEK & ODENDAAL, 1994). Em sua forma vegetativa, desenvolve-se em ambientes de anaerobiose como em carcaças em decomposição

(TOKARNIA et al., 1970a; KRIEK & ODENDAAL, 1994), matéria vegetal em putrefação (KRIEK & ODENDAAL, 1994), ou no lodo de águas paradas (LANGENEGGER, DÖBEREINER & TOKARNIA, 1983; SOUZA, 2001; FERREIRA, 2002) e nestas condições ocorre a formação de toxinas potentes e antigenicamente diferentes entre si (OGUMA et al., 1980; OGUMA et al., 1981; OGUMA et al., 1984; OCHANDA et al., 1984; TERAJIMA et al., 1985; MORIISHI et al., 1989).

A esporulação é uma característica importante do gênero *Clostridium* e corresponde ao mecanismo mais eficiente de sobrevivência do microorganismo (KRIEK & ODENDAAL, 1994). Os esporos do *C. botulinum* mantêm-se viáveis no solo, mesmo em pequenas concentrações durante muitos anos (SEIFERT & BÖHNEL, 1994), passam inofensivamente por meio do tubo digestivo dos animais (SEIFERT & BÖHNEL, 1994) e a sua ocorrência nas fezes constitui-se numa das formas de disseminação na natureza (BLOBEL & SCHLIESSER 1980; SOUZA, 2001; FERREIRA, 2002).

Os esporos de *C. botulinum* são os mais resistentes entre os esporos de bactérias, permitindo que o mesmo sobreviva em meios com condições adversas ao seu crescimento. São resistentes aos raios ultravioletas e vários agentes químicos (alcoóis, componentes fenólicos, compostos de amônia quartenária e mercúrios orgânicos). Substâncias tais como óxido de etileno ou de propileno e formaldeído matam os esporos de *C. botulinum*, porém, não muito rapidamente. Os esporos são efetivamente destruídos pelo aquecimento com temperaturas entre 80 a 121°C, por 15 minutos e por meio da irradiação (SMITH, 1977; KRIEK & ODENDAAL, 1994; HATHEWAY & FERREIRA, 1996).

As amostras de *C. botulinum* são sensíveis a presença de oxigênio, o qual inibe o seu crescimento; estes microorganismos podem ser considerados como anaeróbios estritos, com exceção de algumas amostras do grupo três (KRIEK & ODENDAAL, 1994). A maioria das amostras toxigênicas dos tipos C e D são muito exigentes em termos de crescimento, sendo que este não ocorre em superfícies que tenham sido expostas ao ar em alguns minutos (SKULBERG & HAUSKEN, 1965). Entre os tipos, o C é o mais exigente quanto à anaerobiose (MEYER, 1929). As amostras mais tóxicas são as mais exigentes e formam poucos esporos (SKULBERG & HAUSKEN, 1965).

## 2.1.2 Neurotoxinas botulínicas

### 2.1.2.1 Estruturas

A toxina botulínica é uma neurotoxina de peso molecular variável, porém elevado (ABRAMS, KEGELES, HOTTLE, 1946) de 150 a 160.000 daltons, e é sintetizada como cadeias de polipeptídios simples. Durante o processo de biossíntese é associada a proteínas atóxicas, formando um complexo protéico (POULAIN & HUMEAU, 2003). Depois de produzidas e liberadas pelas bactérias, as toxinas são clivadas por proteólise e formam dois fragmentos não idênticos, onde um é constituído de uma cadeia ou subunidade pesada, com peso molecular de 100.000 daltons e o outro de uma cadeia ou subunidade leve, com peso molecular de 50.000 daltons, ligadas por uma ponte dissulfídrica e outras ligações não covalentes (STEPHEN & PIETROWSKI, 1986; POULAIN & HUMEAU, 2003).

As toxinas botulínicas apresentam as mesmas propriedades da maioria das proteínas, exceto a relativa resistência à proteólise enzimática em condições naturais. Podem ser inativadas por tratamento com temperaturas a 80 °C por 10 minutos (SMITH, 1977).

Sua estrutura molecular é complexa e isto é verificado no seu comportamento como antígeno, sendo que os peptídeos homólogos responsáveis pela patogênese da doença podem ter ação secundária como agente imunogênico (SUGIYAMA, 1980; SAKAGUCHI, 1983).

Atualmente são conhecidos distintos sorotipos de toxinas botulínicas: A, B, C, D, E, F, G. Embora todos interfiram na liberação da acetilcolina nas terminações nervosas, existem diferenças entre eles com relação à biossíntese, tamanho e mecanismo de ação intracelular (CARRUTHERS, 2002; POULAIN & HUMEAU, 2003).

Em estudos de amostras do tipo C, Jansen & Knoet (1977), concluíram que o principal fator tóxico é o fator C<sub>1</sub>, sendo esta uma característica relevante para a classificação da bactéria que seria apenas *C. botulinum* tipo C, com base na produção do fator tóxico C<sub>1</sub>. A toxina C<sub>2</sub> não é considerada uma neurotoxina, devido à ausência da ligação covalente entre as cadeias leve e pesada e pela ausência da ação neurotóxica (HAUSCHILD, 1990). As toxinas A, B, E e F são frequentemente responsáveis pelo botulismo em humanos (ACHA & SZYFRES, 1986) enquanto as toxinas C e D e mais raramente as toxinas A e B causam o botulismo nos animais (SMITH & SUGIYAMA, 1988; KRIEK & ODENDAAL, 1994), estando as toxinas C e D relacionadas aos casos de botulismo em ruminantes, principalmente em bovinos (TOKARNIA et al., 1970a; LANGENEGGER, DÖBEREINER, & TOKARNIA et al., 1983; KRIEK & ODENDAAL, 1994; DUTRA, 2001).

### 2.1.2.2 Mecanismo de ação

A intoxicação ocorre a partir da ingestão da toxina botulínica previamente formada pelo *C. botulinum* nos alimentos e águas contaminados e nos ossos em decomposição (TOKARNIA et al, 1970a; LANGENEGGER, 1981; KRIEK & ODENDAAL, 1994; DUTRA, 2001). A toxina consegue passar ilesa pela ação do suco gástrico devido à presença das proteínas atóxicas. Ao chegar ao intestino delgado e na porção mais alta do intestino grosso, ocorre dissociação da toxina com as proteínas transportadoras, levando a ligação da mesma com o receptor na superfície dos enterócitos (POULAIN & HUMEAU, 2003).

O complexo neurotoxina e receptor sofre endocitose, sendo transportado para a membrana basal da célula da mucosa intestinal onde é secretada por exocitose. Esse processo permite a neurotoxina atravessar a barreira digestiva e disseminar-se pelo organismo através da corrente circulatória e linfática. Através da disseminação pelo organismo, a neurotoxina se liga as terminações nervosas periféricas, principalmente as colinérgicas (sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático), penetrando nas mesmas e inibindo a liberação da acetilcolina. Sua ação limita-se ao sistema nervoso periférico, pois a neurotoxina não consegue atravessar a barreira hematoencefálica (POULAIN & HUMEAU, 2003).

O modo de ação intracelular da neurotoxina pode ser dividida em três fases:

- 1) Ligação ao terminal neuronal pré-sináptico;
- 2) Internalização (Compreendendo endocitose e translocação);
- 3) A ação intraneuronal que leva a inibição da liberação do neurotransmissor;

Para exercer o seu efeito é essencial que a toxina penetre no terminal nervoso. Esta internalização é feita por um mecanismo, envolvendo as vesículas endocíticas/lisossomais, mediado por receptores. Este processo é independente do cálcio e é dependente de energia e parcialmente, de estimulação nervosa (PURVES, AUGUSTINE & FITZPATRICK, 2004; DRESSLER, SABERI & BARBOSA, 2005).

A cadeia pesada é responsável pela internalização da toxina nos terminais colinérgicos pré-sinápticos. Por outro lado, a cadeia leve é uma zinco-endopeptidase, responsável pelos seus efeitos tóxicos. Trabalhos bioquímicos têm mostrado que essas toxinas são proteases altamente específicas que clivam proteínas SNARE (*Soluble NSF Attachment protein Receptors*) pré-sinápticas envolvidas com o processo de exocitose das vesículas sinápticas nos terminais nervosos. A destruição destas proteínas pré-sinápticas é a base para a ação destas

toxinas sobre a liberação de neurotransmissores (PURVES, AUGUSTINE & FITZPATRICK, 2004; DRESSLER, SABERI & BARBOSA, 2005).

Inicialmente, a neurotoxina liga-se aos receptores de membrana pré-sináptica do terminal nervoso motor de maneira irreversível. Essa especificidade ao local de ligação garante à toxina alta seletividade para sinapses colinérgicas. Esses receptores pré-sinápticos são responsáveis pela endocitose da neurotoxina para o terminal nervoso motor (POULAIN & HUMEAU, 2003).

Após a interiorização da molécula, a mesma é separada em duas cadeias polipeptídicas por proteases presentes no terminal nervoso motor. Essa clivagem da neurotoxina é considerada um passo importante para sua ativação, uma vez que, enquanto cadeia única de 150.000 daltons, a neurotoxina apresenta pouca atividade farmacológica. Com a clivagem, têm-se dois fragmentos de polipeptídeos: uma cadeia pesada com 100.000 daltons e uma leve com 50.000 daltons (SETLER, 2002; WENZEL, 2004).

Após a clivagem, a cadeia leve é translocada através da membrana da vesícula endocítica para dentro do citossol e se liga com alta especificidade ao complexo protéico SNARE (*Soluble NSF Attachment protein Receptors*). O alvo protéico também varia conforme o sorotipo da neurotoxina botulínica. Atuando como enzimas, as cadeias leves de cada um dos sete sorotipos clivam uma ligação peptídica distinta em um ou mais pontos das proteínas SNARE, de tal forma que nenhum dos sorotipos atua exatamente no mesmo local, o que faz com que suas características de ação e suas potências variem substancialmente, embora todos os sorotipos apresentem o mesmo efeito final: inibição da liberação de acetilcolina na terminação nervosa (SETLER, 2002; POULAIN & HUMEAU, 2003).

A clivagem proteolítica do complexo SNARE realizada pela cadeia leve da toxina botulínica previne a fixação da vesícula sináptica na superfície interna da membrana celular, resultando, assim, no bloqueio da fusão vesicular, efeito este que impede a liberação de acetilcolina, induzindo paralisia flácida nas fibras musculares atingidas (DRESSLER, SABERI & BARBOSA, 2005).

A ação da neurotoxina botulínica no terminal pré-sináptico não promove nenhuma alteração na excitabilidade neuronal. A entrada de íons cálcio que desencadeia a liberação da acetilcolina permanece inalterada, bem como o processo de síntese, armazenamento ou recaptação do neurotransmissor pelo terminal pré-sináptico. Somente a liberação do neurotransmissor, que está correlacionado com o grau de clivagem das proteínas é bloqueada (POULAIN & HUMEAU, 2003).

A toxina C<sub>2</sub> não é considerada uma neurotoxina (HAUSCHILD, 1990). Esta toxina tem ação vascular, letal e enterotóxica (OHISHI, IWASAKI & SAKAGUCHI, 1980; OHISHI & DASGUPTA, 1987). O mecanismo de ação da toxina C<sub>2</sub> ocorre por meio da sua ligação com a proteína plasmática no lúmen intestinal, promovendo a vacuolização das células epiteliais, necrose da mucosa intestinal, edema intercelular, acumulação de fluido intestinal, além de aumento da permeabilidade vascular, hipotensão e hemorragias pulmonares (SIMPSON, 1982; OHISHI & ODAGIRI, 1984; AKTORIES et al., 1986).

Nos ruminantes, parte da toxina botulínica ingerida pelos animais pode não ser absorvida ou pode ser inativada por processos digestivos destrutivos (ALLISON, MALOY, & MATSON, 1976). No entanto, não se conhece quanto tempo a toxina pode permanecer, após sua ingestão, no trato intestinal ou na corrente sanguínea (FJOLSTAD, 1973).

A neurotoxina botulínica produz paralisia flácida progressiva e os animais morrem devido à parada respiratória. De acordo com Smith & Sugiyama (1988), mesmo que a toxina botulínica se ligue aos receptores de forma irreversível, ela não causaria paralisia inicialmente. No entanto, após ocorrida a fixação da toxina no terminal pré-sináptico, a antitoxina homóloga não possuiria mais a capacidade de neutralizá-la (STEPHEN & PIETROWSKI, 1986).

## 2.2 INTOXICAÇÃO BOTULÍNICA EM BOVINOS: EPIDEMIOLOGIA, ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

### 2.2.1 Epidemiologia do botulismo em bovinos

O botulismo em bovinos é uma doença de grande importância econômica e sanitária, sendo uma das principais causas de mortalidade em animais adultos no Brasil (TOKARNIA et al., 1970a; LANGENEGGER, SCARSI & MARTINS, 1984; LANGENEGGER et al., 1981; TURNES LANGENEGGER & SCARSI, 1984; DÖBEREINER et al., 1992; DUTRA & DÖBEREINER, 1995; DUTRA, 2001, LEMOS, 2005). A doença é causada pela ingestão das toxinas tipo C ou D produzidas pelo *C. botulinum*, e sua ocorrência está relacionada principalmente ao manejo inadequado e à alta contaminação ambiental pelos esporos da bactéria (TOKARNIA et al., 1970a; MOREIRA, LIMA & LEITE, 1980; LANGENEGGER et al., 1981, LANGENEGGER, SCARSI & MARTINS, 1984; TURNES, LANGENEGGER & SCARSI, 1984; TOKARNIA, DÖBEREINER, MORAES et al., 1988; DUTRA, 2001; SOUZA, et al., 2001).



O botulismo bovino recebe diversas denominações de acordo com o autor e o local de ocorrência, tais como: Doença das Planícies nos Estados Unidos (SCHMIDT, 1916), Doença Paralisante ou “Lamsiekte”, na África do Sul (THEILER, 1920), Paralisia Bulbar na Austrália (SEDDON, 1922), Paralisia dos membros, no Senegal (CALVET et al., 1965), e Mal Del Aguapey na Argentina (ZURBRIGGEN et al., 1986).

No Brasil, o botulismo foi denominado de Doença da Mão Dura, no estado do Piauí, (TOKARNIA et al., 1970a), Mal do Alegrete, no Rio Grande do Sul (LANGENEGGER, SCARSI & MARTINS, 1984; TURNES, LANGENEGGER & SCARSI, 1984), Brabeza ou Mal do Transporte, no Mato Grosso do Sul (DUTRA & DÖBEREINER, 1995), Doença da Vaca Caída, na Região Sudeste (DUTRA & DÖBEREINER, 1995); Mal das Palhadas, em Goiás (DUTRA, 1997. Comunicação pessoal) e Mal das Cacimbas, também no estado de Goiás (SOUZA, MARQUES & DUTRA, 1997).

Pode-se classificar a apresentação do botulismo em bovinos por meio de duas formas: a forma associado à deficiência de fósforo e associado a alimentos e água contaminados.

#### 2.2.1.1 Botulismo associado à deficiência de fósforo

A forma do botulismo associado à deficiência de fósforo em bovinos acomete animais criados extensivamente em regiões geográficas com deficiência de fósforo no solo ou nas pastagens e onde os animais não recebem suplementação mineral adequada (TOKARNIA et al., 1970a; LANGENEGGER, DÖBEREINER & TOKARNIA, 1983; DUTRA & DÖBEREINER, 1995; DUTRA, 2001). Esta forma de ocorrência é descrita como causa de mortalidade em bovinos, em diversos países, como na África do Sul (THEILER, 1920; ROBINSON, 1930; THEILER & ROBINSON, 1927; HENNING, 1956; KRIEK & ODENDAAL, 1994), no Senegal (CALVET et al., 1965), na Austrália (SEDDON, 1925; CRAVEN, 1964; SIMMONS & TAMMEMAGI, 1964), Estados Unidos (SCHMIDT, 1916) e países na América do Sul, incluindo o Brasil (TOKARNIA et al., 1970a; LANGENEGGER, SCARSI & MARTINS, 1984; TURNES, LANGENEGGER & SCARSI, 1984; MENDÉZ et al., 1987; BALDASSI et al., 1991; DÖBEREINER et al., 1992; DUTRA & DÖBEREINER, 1995; LISBOA et al., 1996; DUTRA, 2001) e Argentina (ZURBRIGGEN et al. 1986).

A deficiência de fósforo é observada no solo e nas pastagens localizadas nas regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo em quase todos os solos do mundo (UNDERWOOD, 1981; McDOWELL, 1999; TOKARNIA, DOBEREINER, & PEIXOTO, 2000). A quantidade de fósforo presente nas forragens destas regiões varia consideravelmente e é influenciada pela

disponibilidade do elemento no solo, pelo estágio e maturidade da planta e pelo clima (UNDERWOOD, 1981). A deficiência de fósforo atinge várias espécies animais, merecendo atenção especial os bovinos, (GONZÁLEZ, OSPINA & BARCELLOS, 1998), sendo que dentre estes, os mais afetados são bovinos em pastejo, especialmente as vacas em gestação ou em lactação e menos frequentemente em machos e novilhas (TOKARNIA et al., 1970a; TOKARNIA et al., 1970b; LANGENEGGER, 1981; DUTRA & DÖBEREINER, 1995, LISBOA et al., 1996).

Nas regiões onde há a deficiência de fósforo no solo, a suplementação nas dietas é obrigatória, principalmente, para animais herbívoros estritos, como os ruminantes. Isto corre porque as forrageiras, que normalmente não possuem grandes quantidades de fósforo, apresentam quantidade ainda menor, quando provenientes de solos pobres deste mineral (TOKARNIA et al., 1970a, TOKARNIA et al., 1970b; UNDERWOOD, 1981).

Em períodos de deficiência, os animais são capazes de remover até 30% de fósforo depositado nos ossos (GONZÁLEZ, OSPINA & BARCELLOS, 1998). Bovinos, com dieta deficiente em fósforo (severa ou prolongada), podem desencadear anormalidade nos ossos e dentes, crescimento abaixo do normal, queda na produção de leite, diminuição do apetite, baixa eficiência do alimento, comprometimento da fertilidade e a alterações nos hábitos alimentares, que leva a ingestão de ossos (osteofagia) ou alotriofagia (UNDERWOOD, 1981). Este hábito é chamado de pica e encontra-se associado à ocorrência de botulismo em bovinos (TOKARNIA et al., 1970a; TOKARNIA, et al., 1970b; LANGENEGGER, SCARSI & MARTINS, 1984; TURNES, LANGENEGGER & SCARSI, 1984; DÖBEREINER et al., 1992; DUTRA & DÖBEREINER, 1995; LISBOA et al., 1996; DUTRA, 2001)

Os primeiros casos de botulismo, associado à deficiência de fósforo, foram relatados na África do Sul, onde a doença era uma das causas mais importantes de mortalidade na Província do Cabo. Na região, a doença ficou conhecida como “Lamsiekte”. As mortes comumente iniciavam na estação quente, quando o pasto era escasso e os animais apresentavam osteofagia. A doença começava a diminuir, quando iniciavam os períodos de chuvas e a qualidade do pasto melhorava, tornando-se mais viçoso (KRIEK & ODENDAAL, 1994). Dentre as categorias de animais mais atingidos, estavam as vacas em lactação e animais em fase de crescimento (HENNING, 1956).

Em 1920, Theiler reproduziu experimentalmente a doença, fornecendo aos bovinos pupas de varejeiras coletadas próximo a carcaça de bovino morto pela doença, confirmando que “Lamsiekte” era causada pela ingestão de ossos de carcaças de animais em decomposição nas pastagens. Em 1956 (Henning) associou a ocorrência de “Lamsiekte” com o apetite

depravado, manifestado pelos animais e a deficiência de fósforo observada nos solos e nas pastagens.

Theiler (1920) explicou a causa de “Lamsiekte” em bovinos através de seis elementos, onde a retirada de um deles impediria a ocorrência da doença, sendo eles: 1 - a presença do agente toxigênico, o qual produz a toxina durante sua multiplicação em matéria orgânica em decomposição; 2 - a toxina produzida; 3 - material de carcaças onde o agente multiplica-se e a toxina é elaborada; 4 - osteofagia, induzindo o animal a devorar ossos pútridos ou material de carcaças que normalmente evitariam; 5 - deficiência de fósforo na vegetação onde os animais pastejam; 6 - deficiência de fósforo no solo.

Robinson (1930) identificou a bactéria causadora da doença como pertencente ao grupo dos *Clostridium*, sendo neste caso o *C. botulinum* dos tipos C e D.

Há uma aparente variação geográfica na distribuição dos diferentes tipos de *C. botulinum* envolvidos no botulismo em bovinos. A toxina botulínica tipo B parece ser a causa mais frequente do botulismo em animais pecuários nos Estados Unidos e na Europa, as toxinas dos tipos C e D parecem ser a causa mais importante do botulismo em países do Hemisfério Sul, América do Sul, assim como na Austrália e na África do Sul (KRIEK & ODENDAAL, 1994).

O primeiro diagnóstico da ocorrência de botulismo no Brasil foi realizado na Região de Campo Maior, no estado do Piauí em bovinos criados extensivamente (TOKARNIA et al., 1970a). A doença ficou conhecida como “Doença da Mão Dura” e o *C. botulinum* tipos C e D foi isolado das carcaças de bovinos acometidos pela doença (TOKARNIA et al., 1970a). Em 1984 a doença foi relatada no Rio Grande do Sul, sendo conhecida como “Mal do Alegrete” (LANGENEGGER, SCARSI & MARTINS, 1984) e a partir de amostras de solos subjacentes as carcaças e em amostras de cadáveres de bovinos putrefatas foi detectada a presença do *C. botulinum* tipo D (TURNES, LANGENEGGER & SCARSI, 1984). Em 1987 a doença foi novamente descrita no Rio Grande do Sul, no município de Rio Grande, também associada à presença de *C. botulinum* tipo D em amostras de solos subjacentes as carcaças em decomposição (MENDÉZ et al., 1987). A doença também foi descrita no Estado de São Paulo, com isolamento *C. botulinum* tipos C e D (LISBOA et al., 1996, DUTRA, 2001) e no Estado de Santa Catarina (GAVA, 1987. Comunicação pessoal).

No Brasil, os fatores que contribuíram para a disseminação do botulismo associado à deficiência de fósforo foram: 1) deficiência de fósforo nas regiões do cerrado e campos naturais e a inadequada suplementação mineral, desencadeando a osteofagia; 2) o incremento na demanda de fósforo dos animais melhorados zootecnicamente, principalmente das raças

zebuínas; 3) introdução de forrageiras com baixa demanda de fósforo (por exemplo: *Brachiaria* spp), que permitiu a ocupação de extensas áreas para criação de bovinos; 4) o aumento da mortalidade de bovinos pelo botulismo e a inadequada remoção de carcaças contaminadas pelo *C. botulinum* nos locais de ocorrência da doença (LANGENEGGER, DÖBEREINER & TOKARNIA, 1983; LANGENEGGER, SCARSI & MARTINS, 1984; DÖBEREINER et al., 1992, DUTRA, 2001).

#### 2.2.1.2 Botulismo associado a alimentos e água contaminados

A forma do botulismo associado à ingestão de águas e alimentos contaminados ocorre em animais quando estes recebem alimentos ou água contaminados pela toxina botulínica, resultando em mortalidade de um grande número de animais em um curto período de tempo (DUTRA et al., 1990; KRIEK & ODENDAAL, 1994, DUTRA, 2001).

Alimentos contaminados e armazenados em condições inadequadas podem servir de substrato para o crescimento do *C. botulinum* e produção de toxinas (KRIEK & ODENDAAL, 1994, DUTRA, 2001). O mesmo pode ocorrer em águas estagnadas, valas de captação ou ao redor de cochos de sal, bem como em cacimbas utilizadas como bebedouros para bovinos (DUTRA et al., 1990; SOUZA, MARQUES & DUTRA, 1997; SOUZA, 2001; DUTRA, DÖBEREINER & SOUZA, 2005; SOUZA et al., 2006).

O botulismo hídrico, através da contaminação de água com carcaças foi descrito no Senegal em bovinos, ovinos, asininos e equinos, associados às toxinas botulínicas dos tipos C e D (THIONGANE, LEFORBAN & DOUTRE, 1984); no Canadá em bovinos, associados a toxina botulínica tipo C (WOBESER, BAPTISTE & CLARK, 1997) e no Brasil em búfalos (LANGENEGGER & DÖBEREINER, 1988) e em bovinos relacionados a toxinas botulínicas tipos C e D (DUTRA et al., 1990; SOUZA, MARQUES & DUTRA, 1996; SOUZA, MARQUES & DUTRA, 1997, DUTRA et al., 2001).

A ocorrência de casos de botulismo associados à utilização da cama de frango contaminada pode ocorrer por meio da administração da cama de frango como alimento para bovinos (McLOUGHLIN, MCILROY & NEIL, 1988; KRIEK & ODENDAAL, 1994) ou por meio da sua utilização como adubação para as pastagens, possibilitando o acesso e a ingestão pelos animais (HOGG, WHITE & SMITH, 1990; VERONEZI et al., 2009).

Como suplementação alimentar a ingestão de cama de frango foi associada a surtos na Inglaterra (McLOUGHLIN, MCILROY & NEIL, 1988; NEILL, McLOUGHLIN & MCILROY, 1989 e HOGG, WHITE & SMITH, 1990), no Quebec (BIENVENU & MORIN,

1990) e no Brasil (LOBATO et al., 1995; ORTOLANI et al., 1996; DUTRA et al., 2001; DUTRA, DÖBEREINER & SOUZA, 2005, e LOBATO et al., 2008). Como fertilizante de pastagem a intoxicação foi descrita na Irlanda do Norte (MCLLROY, MCCRACKEN & HUEY, 1987) e na Inglaterra, (CLEGG et al. 1985).

Smith (1977) denominou de “intoxicação da forragem”, o botulismo decorrente do consumo de feno ou silagem contaminada pela carcaça de pequenos animais mortos acidentalmente e incorporados ao alimento durante a sua preparação. A contaminação de silagem foi descrita na Holanda (BREUKINK et al., 1978; HAAGSMA & TER LAAK, 1978) e na Finlândia (MYLLYKOSKI et al., 2009). No Brasil essa forma foi descrita associada ao consumo de silagem de milho (VARGAS et al., 1997; DUTRA, SOUZA & DÖBEREINER, 2001), de sorgo (DUTRA, 2001) e milho contaminado (DUTRA, 2001; COSTA, SALVADOR & PEREIRA, 2008).

Surtos de botulismo foram relatados associados à ração contaminada com toxina tipo C, nos EUA (GALEY et al., 2000). Também foram relatados surtos associado à contaminação do feno de festuca e de centeio, ambos ocasionados pela toxina tipo B, nos Estados Unidos (WILSON, BOLEY & CORWIN, 1995). Ainda no Canadá, foi descrito, surto relacionado à utilização de resíduos de padaria na alimentação de bovinos em confinamento, com detecção da toxina botulínica tipo D (HEIDER, MCCLURE & LEGER, 2001).

Surtos por meio da ingestão de toxinas botulínicas produzidas em poças de água estagnadas também foram relatados. Isto ocorreu devido à presença de carcaças ou mesmo matéria orgânica vegetal em decomposição (SOUZA, MARQUES & DUTRA, 1997; DUTRA, 2001; FERREIRA, 2002; SOUZA et al., 2006).

### 2.2.2 Quadro clínico-patológico do botulismo em bovinos

Os sinais clínicos apresentados pelos animais variam consideravelmente e dependem da quantidade de toxina absorvida. Quanto maior a quantidade da toxina ingerida, menor é o período de incubação e mais rápida é a evolução clínica (HENNING, 1956).

Animais afetados pelo botulismo são afebris e tipicamente manifestam quadro clínico de paralisia flácida parcial ou completa dos músculos da locomoção, mastigação e deglutição. A paresia, que progride à paralisia, normalmente começa nos membros posteriores, evoluindo progressivamente, afetando os membros anteriores, o pescoço e a cabeça. A percepção sensorial e os reflexos pupilares são mantidos durante um tempo considerável após o início da paralisia, e, geralmente, os animais permanecem mentalmente alerta. Em alguns casos atípicos

é visualizada apenas a paralisia dos músculos da mastigação e deglutição, porém os músculos do sistema locomotor não estão afetados (STÖBER, 1984; STÖBER, 2002). Na fase final da intoxicação botulínica, os animais assumem a posição de decúbito lateral, morrendo em períodos variáveis (KRIEK & ODENDAAL, 1994)

Um sinal clínico muito importante, observado em casos de botulismo, é a dificuldade respiratória apresentada pelos animais, que é observada nos flancos, principalmente quando os animais se encontram em decúbito. A respiração é bifásica no momento da inspiração, com uma rápida tentativa inicial de distensão do tórax, seguida de uma segunda fase, que geralmente é prolongada e dificultosa, que conta com o auxílio do diafragma. O movimento de expiração é prolongado. Na evolução clínica superaguda essa dificuldade respiratória é mais acentuada. Este tipo de respiração abdominal ou diafragmática, sendo bifásica no movimento de inspiração, ocorre apenas em casos de botulismo, devido alguma miodistrofia diafragmática ou quando há hérnia diafragmática (STÖBER, 1984; STÖBER, 2002).

A doença foi arbitrariamente dividida em quatro formas clínicas de evolução (HENNING, 1956). Formas superaguda, aguda, subaguda e crônica, baseadas no início da doença, na sucessão dos eventos durante o desenvolvimento de paralisia em grupos musculares diferentes e na severidade dos sinais clínicos (THEILER & ROBINSON, 1927).

A forma superaguda da doença caracteriza-se por apresentar uma evolução muito rápida, com a morte ocorrendo até 24 horas após o início dos sinais clínicos. Em condições naturais, casos de intoxicação superagudos são difíceis de serem observados e os animais são normalmente encontrados mortos. Experimentalmente os sinais clínicos observados constituem no comprometimento dos músculos da locomoção, mastigação e deglutição. Os animais ficam deitados e apresentam paralisia dos membros posteriores (STÖBER, 1984). Quando permanecem em decúbito esternal, os animais se mantêm em posição de auto-auscultação, com a cabeça voltada lateralmente ao flanco, podendo ocorrer à protrusão da língua e sialorréia intensa (STÖBER, 1984; DUTRA, 2001).

Na forma aguda a evolução clínica ocorre no período de 24 a 48 horas. Os sinais clínicos se comparados com os da forma superaguda seriam os mesmos, diferindo apenas na intensidade da evolução da doença. O apetite pode estar presente em alguns casos, porém na maioria destes, ele está ausente (STÖBER, 1984; DUTRA, 2001).

A forma subaguda da doença caracteriza-se por evolução de três a sete dias. No início do curso da doença, o animal permanece em pé, pode manifestar dificuldade de locomoção, podendo cair, quando forçado a se movimentar. Os músculos da mastigação e da deglutição não estão totalmente afetados, podendo se observar alguns movimentos de deglutição. Nesta

forma de evolução da doença, os sinais clínicos diferem da forma aguda apenas na intensidade e no período de evolução (STÖBER, 1984; DUTRA, 2001).

Na forma crônica do botulismo, a evolução clínica e eventualmente a morte ocorrem acima de sete dias. O tônus muscular geralmente permanece aparentemente inalterado. Os movimentos mastigatórios são lentos, permitindo que o animal possa se alimentar, aliado a paralisia dos membros posteriores, permanecendo em decúbito a maior parte do tempo. Em alguns casos, os animais conseguem se levantar sem auxílio (STÖBER, 1984; DUTRA, 2001). Ainda pode ser observada perda da condição corporal e, até mesmo, desidratação, quando o apetite estiver comprometido (DUTRA, 2001).

Na fase final da intoxicação botulínica, em todas as formas, os animais assumem a posição de decúbito lateral, morrendo em períodos variáveis (DUTRA, 2001)

Atualmente descreve-se uma nova forma de intoxicação botulínica em bovinos, denominada de “botulismo visceral”, secundária à absorção de pequena quantidade da toxina botulínica durante um longo período de tempo, interferindo no controle neurológico da fisiologia intestinal (BÖHNEL, SCHWAGERICK & GESSLER, 2001; BÖHNEL, NEUFELD, & GESSLER, 2005). Essa forma ainda não foi relatada no Brasil.

Geralmente não são observadas lesões macroscópicas ou microscópicas primárias associadas à intoxicação botulínica em bovinos (TRUEMAN et al., 1992; DUTRA, 2001; LEMOS et al., 2001; RADOSTITS et al., 2002), apesar de, na necropsia poder ser encontrado material alimentar suspeito ou mesmo pedaços de ossos nos pré-estômagos ou estômagos, podendo ser sugestivo de botulismo (RIET CORREIA et al., 1983; MENDEZ et al., 1987). Alterações inespecíficas como hemorragias subendocárdias e subepicárdicas, excesso de líquido no saco pericárdico e edema pulmonar podem ser observadas, assim como alterações gordurosas no fígado e necrose de decúbito em grandes massas musculares (HENNING, 1956; TRUEMAN et al., 1992). Ainda pode estar presente uma enterite catarro-hemorrágica e congestão intestinal (HENNING, 1956).

### 2.2.3 Diagnóstico clínico e laboratorial do botulismo em bovinos

O diagnóstico de botulismo em bovinos é feito através dos dados epidemiológicos, juntamente com o quadro clínico-patológico e ausência de lesões específicas observadas no exame de necropsia (KRIEK & ODENDAL, 1994; DUTRA, 2001). O diagnóstico definitivo de botulismo é feito através da presença e identificação da toxina botulínica em amostras

coletadas dos animais doentes ou mortos há pouco tempo ou na fonte suspeita de conter a toxina (KRIEK & ODENDAL, 1994).

Embora a detecção da toxina botulínica confirme o diagnóstico de botulismo, esta apresenta muitas dificuldades de demonstração, devido ao seu mecanismo de ação, susceptibilidade do animal e a baixa sensibilidade dos testes disponíveis, pois após atingir a sinapse neuromuscular, a toxina altera sua atividade biológica, dificultando sua detecção e a confirmação do diagnóstico (SMITH, 1977; KRIEK & ODENDAAL, 1994; CARDOSO et al., 2004; DUTRA, 2001).

Laboratorialmente o diagnóstico de botulismo é feito por meio da inoculação em camundongo de amostras de fígado, conteúdo intestinal, conteúdo ruminal ou soro sanguíneo de animais suspeitos de botulismo, assim como de amostras de alimentos relacionados à intoxicação ou amostras ambientais para a identificação de cepas isoladas (DOWELL & HAWKINS, 1974; SMITH, 1977). A confirmação ocorre quando a toxina presente no material testado é neutralizada pela antitoxina botulínica específica (SMITH, 1977)

Os materiais suspeitos são inoculados intraperitonealmente em camundongos. Um segundo grupo de animais de laboratório inoculados previamente com antitoxinas específicas recebem o material suspeito com inoculação intraperitoneal. Esses animais são observados por um período de 96 horas. O teste é considerado positivo, quando os animais sem proteção desenvolvem sinais clínicos e morrem e os animais soroneutralizados não desenvolvem o quadro clínico (SMITH, 1977).

O bioensaio e a soroneutralização em camundongo corresponde a uma técnica sensível e específica para o diagnóstico de botulismo, contudo apresentam algumas limitações como o tempo necessário para a realização e o grande número de animais utilizados, principalmente quando ocorrem mortes não específicas nos animais de laboratório envolvidos no teste (Hatheway & Ferreira, 1996). Além disso, podem ocorrer erros como a inibição da neutralização devido à presença de substâncias de baixo peso molecular que podem ser letais para os camundongos (Dezfulian & Bartlett, 1984).

Para avaliar a sensibilidade epidemiológica da soroneutralização em camundongo Dutra (2001) realizou um estudo comparativo entre as amostras de soro sanguíneo, fígado, conteúdo ruminal e conteúdo intestinal de bovinos com botulismo aplicando a técnica de soroneutralização em camundongos, obtendo os seguintes resultados: Quando foram utilizadas as quatro amostras, 43,4% dos materiais foram considerados positivos em pelo menos uma destas. Quando em análises simultâneas, o teste apresentou sensibilidade de 43,1 % para avaliação das amostras do fígado e conteúdo intestinal simultaneamente; de 43% para



análise simultânea das amostras de fígado, conteúdo ruminal e intestinal e de 31,8% na análise em conjunto das amostras de fígado e conteúdo ruminal. Quando analisados separadamente a sensibilidade do teste foi menor, sendo de 21,1% no fígado, 19,88% no conteúdo ruminal, de 18,65% e no conteúdo intestinal e 3,67% no soro sanguíneo.

Além do bioensaio e soroneutralização outros testes podem ser usados para o diagnóstico do botulismo como, radioimunoensaio (RIA), hemoaglutinação reversa passiva (RPHA), látex aglutinação reversa passiva (RPLA), ensaio imunoenzimático (ELISA) (TAKAHASHI, KAMEYMA & SAKAGUCHI, 1990), microfixação de complemento (WEISS & WEISS, 1988; WEISS et al., 1991; DUTRA et al., 1993, MENEGUCCI, DUTRA & DÖBEREINER, 1998), imunoafinidade em coluna cromatográfica (GESSLER, HAMPE & BÖHNEL, 2005; KLEWITZ et al., 2006) e PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (CHAFFER et al., 2006). Entretanto, o desenvolvimento e utilização de técnicas “in vitro” geralmente apresentam sensibilidade menor que a inoculação em camundongos (SMITH, 1977; SHONE et al., 1985; TAKAHASHI, KAMEYMA & SAKAGUCHI, 1990; SILVA et al., 1991; THOMAS, 1991), que apesar de apresentar sensibilidade de apenas 43,4%, (DUTRA, 2001), continua sendo o teste o mais sensível e específico para a detecção da toxina botulínica. (TAKAHASHI, KAMEYMA & SAKAGUCHI, 1990). Com exceção, a técnica de microfixação do complemento, que apresentou resultados satisfatórios se comparados ao bioensaio em camundongo (WEISS & WEISS, 1988; WEISS et al., 1991; DUTRA et al., 1993).

Vários fatores estão envolvidos na baixa sensibilidade da técnica de bioensaio e soro neutralização em camundongo como o tempo entre a coleta das amostras e a realização do teste, pois a sensibilidade é diretamente proporcional a rapidez com que é realizado, bem como a adequada refrigeração das amostras coletadas. Além disso, a existência de associação significativa entre a evolução clínica e o resultado da soroneutralização em camundongos também influenciam na especificidade do teste. Em um estudo com 327 casos analisados o resultado positivo na soroneutralização foi de 45,83% na evolução clínica superaguda, 56% na aguda, 31,86% na subaguda e 18,42% dos animais com evolução crônica (DUTRA 2001). Outro ponto a ser considerado no diagnóstico laboratorial é o fato de que os esporos podem estar presentes saprofitamente no conteúdo intestinal e fígado de animais saudáveis (MÜLLER 1967 e DUTRA et al. 1996).

Estes fatores ressaltam a importância do histórico clínico e a ausência de achados anatomopatológicos para o diagnóstico do botulismo em bovinos (MÜLLER, 1967, LANGENEGGER & DÖBEREINER, 1988; SANTOS et al., 1993; LISBOA et al., 1996;

DUTRA, 2001; LEMOS, 2005). Segundo Dutra (2001) o diagnóstico, mesmo que negativo no bioensaio e soroneutralização, pode ser realizado com base nos sinais clínico-patológicos e epidemiológicos da doença.

#### 2.2.4 Diagnóstico diferencial

Deve-se fazer o diagnóstico diferencial das doenças que cursam com sinais neurológicos assim como das doenças que cursam com sinais musculares (KRIEK & ODENDAAL, 1994). Dentre as doenças, deve-se levar em consideração a raiva, intoxicação por chumbo, doença de aujeszky, abscessos cerebelares e listeriose (STÖBER, 1984; KRIEK & ODENDAAL, 1994).

Em relação aos ruminantes, devem-se incluir outros diagnósticos diferenciais importantes como a polioencefalomalácia, hipocalcemia, hipomagnesemia, miopatias nutricional ou induzida por intoxicação por plantas e intoxicação por ionóforo. Em bovinos, a ingestão da toxina produzida pelo fungo *Aspergillus clavatus*, intoxicação por organofosforado e babesiose cerebral, visto essas doenças possuírem alguns sinais clínicos semelhantes ao botulismo (KRIEK & ODENDAAL, 1994).

#### 2.2.5 Tratamento e controle do botulismo em bovinos

Pode-se realizar a administração do anti-soro hiperimune polivalente ou específico para a toxina envolvida no surto, podendo ajudar na recuperação dos animais acometidos nas fases iniciais da doença. Outros sinais clínicos inespecíficos podem ser tratados, como a desidratação através da administração de fluidos por via oral e animais em decúbito lateral por meio de um sistema de apoio para mantê-los em decúbito esternal. As medidas indicadas na prevenção do botulismo associado à osteofagia em animais criados extensivamente são a vacinação, a correção da deficiência de fósforo e a remoção das carcaças (KRIEK & ODENDAAL, 1994; DUTRA, 2001).

A vacinação contra botulismo é usada eficientemente na África do Sul desde 1938 (MASSON et al., 1938). Esta prática também é empregada na Austrália (BENNETTS & HALL, 1938; CRAVEN, 1964; TAMMEMAGI & GRANT, 1967; JANSEN, KNOETZE & VISSER, 1976) e no Brasil (DUTRA & DÖBEREINER, 1996 e LOBATO et al., 1999; DUTRA, 2001; FONSECA, 2001; STEINMAM, et al., 2006; CURCI et al., 2008).

A correção da deficiência de fósforo deve ser feita no solo ou na suplementação animal, que pode ser feita com o uso de misturas minerais, contendo como fonte de fósforo a farinha de osso ou fosfato bicálcico. A suplementação mineral na ração não só reduz osteofagia e consequentemente a doença, como também traz outros efeitos benéficos como o aumento na produtividade (KRIEK & ODENDAAL, 1994).

A remoção das fontes da intoxicação é feita por meio da remoção das carcaças nas pastagens e incineração. Esta prática previne a multiplicação dos agentes nas carcaças, a produção de toxinas e a contaminação do solo com os esporos. A prática de enterrar as carcaças também não é recomendada, pois pequenos mamíferos ou animais selvagens podem desenterrá-los e arrastá-los para fora, ficando novamente disponíveis para os animais (KRIEK & ODENDAAL, 1994; DUTRA, 2001). A pré-compostagem de cadáveres pode ser uma alternativa eficiente na destruição de resíduos agropecuários, quando respeitados os devidos períodos para decomposição (CURCI et al., 2007).

Outro método para o controle do botulismo, particularmente em relação ao controle do botulismo associado a alimentos contaminados, pode ser feito a partir da inspeção rigorosa dos suplementos alimentares fornecidos aos animais. As silagens devem ser produzidas em condições de pH ácido que impedem a germinação dos esporos aí presentes e a consequente produção de toxinas, visto que estas não ocorrem em pH inferior 5,3. Fenos devem ser desidratados como indicado e armazenados de forma adequada, para também se evitar a produção de toxinas. Aliadas a essas medidas, a vacinação deve ser empregada de forma estratégica, principalmente, em confinamentos onde se utilizam suplementos alimentares com risco de conterem a toxina botulínica (KRIEK & ODENDAAL, 1994; DUTRA, 2001).

## 2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO BOTULISMO NO BRASIL

Em 1970 foram registrados os primeiros surtos de intoxicação botulínica em bovinos no interior do Piauí. Na ocasião, foi comprovado pela primeira vez, a ocorrência da doença no Brasil, estando associada à alta contaminação por *C. botulinum*, ao hábito dos animais de roer ossos, ao melhoramento zootécnico do gado nativo, e criação destes em áreas pobres em fósforo e sem a adequada suplementação mineral (TOKARNIA et al., 1970a; TOKARNIA et al., 1970b; TOKARNIA et al., 1988). A partir dessa data foram observados cada vez mais surtos de botulismo em extensas regiões dos estados do Maranhão, Tocantins, Goiás, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Espírito Santo e São

Paulo (TURNES et al., 1984; DÖBEREINER et al., 1990; DÖBEREINER et al., 1992; DUTRA et al., 1990).

Na década de 1960, no Estado do Piauí, a doença dizimou um grande número de animais na região, onde 15.000 bovinos, de um total de 100.000, morreram num período de seis anos (TOKARNIA et al., 1970). Nas décadas de 1970, 1980 e até meados de 1990, o botulismo foi responsável por grandes surtos nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do país. As estimativas indicaram que mais de seis milhões de animais morreram entre os anos de 1985 a 1999 devidos a intoxicação nessas regiões (DUTRA & DÖBEREINER, 2004).

No Brasil, notadamente a partir de 1986, pecuaristas e técnicos tiveram sua atenção voltada para crescente mortalidade de vacas, principalmente gestantes ou lactantes, ocorrendo em pastagens de solos pobres em fósforo e com maior severidade nos períodos chuvosos. Uma comissão foi convocada para estudar a *causa mortis*, concluindo-se que se tratava de botulismo. Na ocasião estimou-se que o país já havia perdido cerca de 50 mil cabeças, vítimas da doença (ROSA, 1986).

Em 1987, no Rio Grande do Sul, em um surto de botulismo morreram 23 animais de um total de 990 bovinos (MENDÉZ et al. 1987). Em 1990 foram diagnosticados surtos de botulismo nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul onde, de um total de 7.260 animais existentes nas propriedades, 2.566 animais morreram (DUTRA et al., 1990). No Mato Grosso do Sul, entre os anos de 1996 e 1998, estimou-se que o botulismo levou a perda de 195.000 bovinos de uma população de 23 milhões de cabeças e esta elevada mortalidade se estendeu por outras regiões do país como sudeste, nordeste e norte, alcançando o status de uma das principais causas de mortalidade em bovinos, resultando em grandes perdas econômicas na bovinocultura nos diversos sistemas de produção (LIMA & NETA et al., 2007).

Além do botulismo associado à deficiência de fósforo a intoxicação botulínica associada a alimentos e águas contaminados também tem causado prejuízos econômicos para pecuária nacional. Em um estudo com água contaminada nos Estados de do Mato Grosso do Sul e São Paulo, cerca de 9.000 bovinos envolvidos nos surtos, 2.844 morreram com a doença (DUTRA et al., 2001).

A cama de frango contaminada foi responsável, nos estados de São Paulo e Minas Gerais, entre 1989 e 2000, pela morte de 455 animais de um total de 1.535 bovinos (DUTRA et al., 2005). No estado da Paraíba, em um surto com 88 bovinos, 85 morreram de botulismo. Em uma segunda propriedade morreram 233 caprinos, 145 ovinos e 30 bovinos após alimentação com cama de frango contaminada (LOBATO et al., 2008)

Em Minas Gerais, de 148 animais alimentados com milho contaminados, 38 bovinos morreram (COSTA et al., 2008). Em Mato Grosso do Sul de 8.188 animais, 521 animais morreram de botulismo após o consumo de silagem em péssimo estado de conservação (DUTRA, SOUZA & DÖBEREINER, 2001).

O botulismo é uma das principais causas de mortalidade de bovinos no Brasil. Os prejuízos diretos causados pela enfermidade nos últimos 15 anos somam mais de 1,8 bilhões de reais. Como não se trata de doença de notificação obrigatória aos órgãos governamentais, o botulismo é considerado como um problema sanitário próprio dos sistemas de produção. No entanto, com as exigências do mercado europeu, para que os países fornecedores de carne bovina determinem com precisão as causas de mortalidade bovina com sintomatologia nervosa, o diagnóstico desta enfermidade passa a ter prioridade (DUTRA, 2003).

Em um estudo realizado no Mato Grosso do Sul, de agosto de 1993 a novembro de 2000, foram examinados 1307 materiais provenientes de necropsia de bovinos dos quais 890 (68,09%) possuíam histórico de sintomatologia nervosa, sendo que as doenças mais diagnosticadas foram o botulismo (244 casos), seguida de raiva (98 casos), polioencefalomalácia (74 casos) e encefalite por Herpesvírus (50 casos) (BARROS, LEMOS & CAVALLÉRO, 1999). Em Santa Catarina de 2000 a 2008, de 3.585 materiais analisados, 55 casos apresentavam sintomatologia nervosa, desses 21 foram diagnosticados como botulismo, seguidos de intoxicação por *Sida carpinifolia* (9 casos), febre catarral maligna (6 casos) e raiva (5 casos) (Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC, dados não publicados). Esses trabalhos ressaltam a importância econômica do botulismo nos diferentes estados brasileiros.

### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

Realizar levantamento de casos de botulismo em bovinos no Estado de Santa Catarina observados no período de 1987 até 2008, diagnosticados pelo Setor de Patologia Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC).

Caracterizar alguns aspectos epidemiológicos, clínicos, lesionais e detecção de toxinas botulínicas de casos acompanhados nos anos de 2006 a 2008 no Estado de Santa Catarina:

- 1) Realizar uma análise retrospectiva dos casos suspeitos de botulismo bovino no Estado de Santa Catarina e atendidos pelo Setor de Patologia Animal no período de 1987 a 2008.
- 2) Realizar um estudo epidemiológico prospectivo em propriedades rurais com histórico de ocorrência de mortalidade bovina causada pelo botulismo no período de 2006 a 2008 e localizados no Planalto Serrano Catarinense.
- 3) Acompanhar surtos de mortalidade bovina no Estado de Santa Catarina, provocados pela doença no período de 2006 a 2008 e realizar a tentativa de diagnóstico clínico-patológico, epidemiológico e laboratorial.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi realizado em três etapas: levantamento de históricos, de dados epidemiológicos, acompanhamento clínico e patológico de bovinos com botulismo e identificação da toxina botulínica.

### **4.1. LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO**

O levantamento de históricos foi realizado em duas etapas: levantamento de casos clínicos diagnosticados e levantamento de dados a campo.

A primeira parte consistiu no levantamento de casos de botulismo diagnosticados pelo Setor de Patologia Animal CAV/UDESC durante o período compreendido entre os anos de 1987 e 2008.

Para isso foram revisados todos os diagnósticos compatíveis com botulismo em bovinos registrados pelo setor no período de 1987 a 2008, sendo compilados dados referentes às localizações das propriedades, dados epidemiológicos gerais, idade dos animais, sinais clínicos, lesões macroscópicas e histológicas.

A segunda etapa consistiu na realização de visitas às propriedades rurais com histórico anterior de ocorrência do botulismo endêmico, e no levantamento de históricos. Nas propriedades procurou-se obter informações atuais relacionadas ao manejo zootécnico e aspectos epidemiológicos relacionados à condição de risco potencial para a ocorrência da intoxicação.

## 4.2 ACOMPANHAMENTO DE CASOS CLÍNICOS.

Consistiu no acompanhamento de animais clinicamente doentes e na realização de necropsia dos casos com evolução e morte espontânea ou eutanásia quando em estado *in extremis*<sup>1</sup>.

Amostras de vísceras foram coletadas em formalina a 10% para exames histológicos.

Amostras de fígado (aproximadamente 100g), conteúdo ruminal e intestinal (aproximadamente 20 ml de cada) e amostras de compostagem incompleta de carcaças de suínos e aves suspeitas de estarem contaminados foram conservadas sob refrigeração (2 a 8° C) ou congeladas (-20° C) até a análise microbiológica para a tentativa de detecção de toxina botulínica.

## 4.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

### 4.3.1 Exame histológico

As amostras de todas as vísceras foram coletadas e conservadas em formalina tamponada a 10% por 72 horas. Os fragmentos foram desidratados em álcool, clarificados em xilol e incluídos em parafina. Secções de três micrômetros de espessura foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) (PROPHET et al., 1992) e observados no microscópio óptico no Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC.

### 4.3.2. Exame microbiológico

O exame microbiológico foi realizado no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, UNESP - Campus de Araçatuba, São Paulo. Foram realizadas tentativas de detecção de toxina botulínica nos materiais biológicos coletados dos animais suspeitos (exame direto) ou ainda a verificação da presença do *C. botulinum* pela formação de toxina botulínica

---

<sup>1</sup> A eutanásia foi realizada segundo a Resolução N° 714 de 20 de Junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.



em cultivo bacteriológico nas amostras de solo, osso e amostras de compostagem incompleta de carcaças de suínos e aves (exame indireto).

#### 4.3.2.1 Exame direto

As amostras de fígado foram maceradas em Gral estéril com solução fisiológica tamponada, enquanto as amostras de conteúdo ruminal e intestinal foram apenas diluídas (1:2) em gral estéril, também com solução fisiológica, de acordo com metodologia proposta por Smith (1977), para tentativa da detecção da toxina botulínica.

Cada amostra foi homogeneizada até a obtenção de uma suspensão uniforme. Em seguida o material foi coado em gase estéril e mantido sob refrigeração por um período de 12 a 24 horas para a eluição de toxina eventualmente presente. Após este período, o material foi novamente centrifugado a 5000 rpm (Centrífuga Excelsa Baby, Fanen) por 15 minutos e o sobrenadante filtrado (Filtro Millipore, 0,22  $\mu$ m) foi inoculado em camundongo (bioensaio em camundongo).

#### 4.3.2.2 Exame indireto

As amostras de alimento, osso e solo suspeitos foram diluídas em solução fisiológica, em Gral estéril, coadas e inoculadas (1g) em meio de cultura de carne bovina cozida (meio de Wright), segundo o procedimento descrito por Smith (1977). O material foi submetido ao tratamento térmico em Banho-maria à temperatura de 80°C por 60 minutos. Após este procedimento o meio de cultura inoculado foi mantido incubado por cinco dias a 35°C em anaerobiose (Jarras Oxoid, Anaerogen). Após este período o sobrenadante foi centrifugado a 5000 rpm (Centrífuga Excelsa Baby, Fanen), por 15 minutos, filtrado em Millipore (0,22  $\mu$ m), estando assim preparado para a realização do bioensaio em camundongo e soroneutralização. .

#### 4.3.3 Bioensaio em camundongo

Todas as amostras processadas para a tentativa de detecção de toxina botulínica (exame direto) ou detecção de esporos da bactéria (exame indireto) foram divididas inicialmente em duas frações: uma a ser inoculada diretamente nos animais e outra submetida,

previamente, a tratamento térmico de 100°C por dez minutos, para a inativação da toxina possivelmente presente.

As amostras foram inoculadas (0,5 mL) via intraperitoneal em camundongos da raça Swiss, linhagem Webster, de ambos os sexos, com peso de aproximadamente 20 gramas, segundo o procedimento descrito por Smith (1977).

Os camundongos foram observados diariamente por um período de 96 horas para verificar os sinais clínicos sugestivos de botulismo: dificuldade respiratória, incoordenação motora, dificuldade de locomoção, abdômen cintado, asfixia e morte. As amostras não inativadas pela temperatura e que causaram morte ao camundongo foram consideradas suspeitas.

#### 4.3.4 Soroneutralização em camundongo

Na soroneutralização, empregou-se quatro grupos de camundongos em duplicatas. Os Grupos 1 e 2 receberam, respectivamente, antitoxinas C e D<sup>2</sup>, ambas na quantidade de 10 UI/mL. Após 24 horas foram inoculados 0,5 mL de cada material considerado suspeito no teste do bioensaio em camundongo. O Grupo 3 foi inoculado unicamente com o material (0,5 mL) suspeito, enquanto que o Grupo 4 consistiu de camundongos desafiados com o material inativado por tratamento térmico.

Os camundongos inoculados foram observados por um período de 96 horas para a verificação dos sinais clínicos característicos de botulismo e morte. A toxina foi tipificada quando os camundongos inoculados com a antitoxina homóloga, àquela presente nos materiais, sobreviveram.

---

<sup>2</sup> Antitoxinas botulínicas C e D obtidas do “Center for Disease Control”, Atlanta, Georgia, Estados Unidos da América.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO

#### 5.1.1 Número de municípios com diagnóstico de botulismo em bovinos

No período de 1987 a 2008 foram registrados 40 casos compatíveis com botulismo, verificados em seis cidades do estado de Santa Catarina, diagnosticados pelo Setor de Patologia Animal CAV/UEDESC. As cidades correspondentes estão ilustradas no mapa do estado de Santa Catarina (Figura 1). Dos 40 casos, 30 (75%) foram registrados em Lages; dois (5 %) casos nos municípios de Campo Belo do Sul, Erval Velho e Ponte Alta e um caso (2,5%) em Capão Alto, Correia Pinto, Joinville e São Cristóvão do Sul.

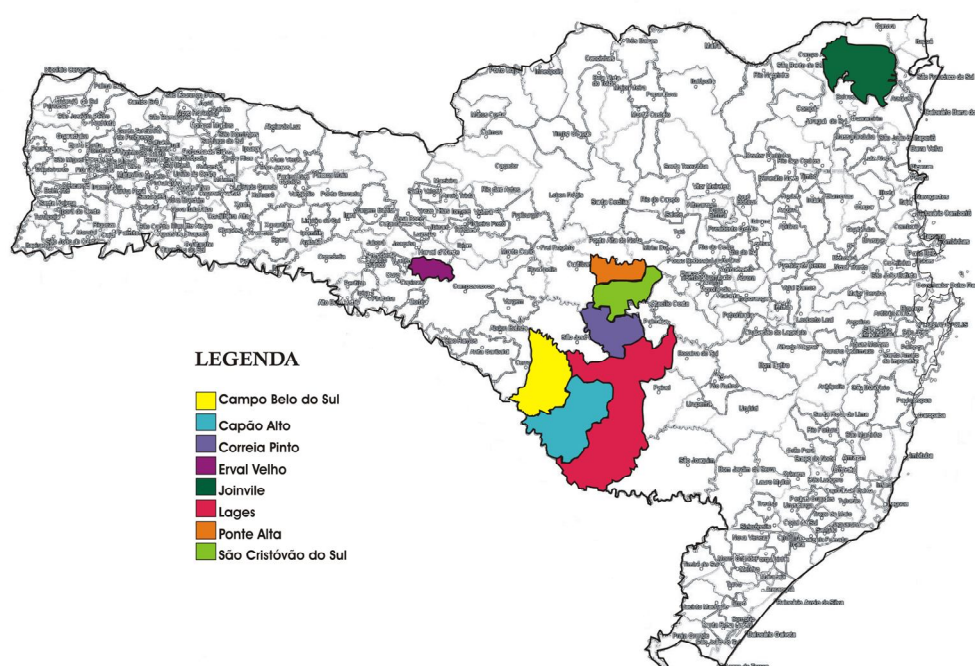


Figura 1- Mapa de Santa Catarina ilustrando os municípios onde ocorreram casos de botulismo em bovinos registrados nos arquivos do Setor de Patologia Animal CAV/UEDESC, no período compreendido entre 1987 a 2008.

Com relação à localização das propriedades onde os casos de botulismo ocorreram, foi possível verificar que a maioria dos casos ocorreu no Planalto Serrano Catarinense (Figura 2) com 36 (90%) casos dos 40 registrados, especificamente no município de Lages com 30 (75%) casos, destes 26 (86,67%) casos na região da Coxilha Rica.

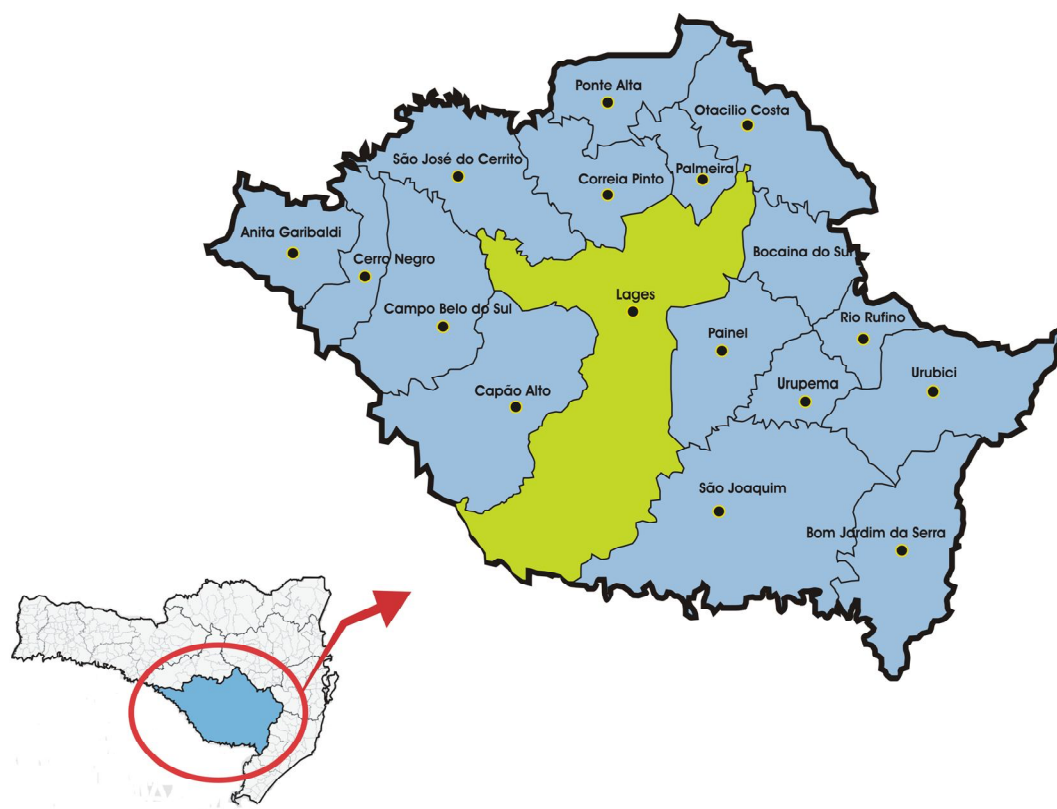


Figura 2 - Mapa do Planalto Serrano Catarinense, com destaque para o município de Lages. No canto inferior esquerdo da figura, mapa de Santa Catarina destacando a região do Planalto Catarinense.

### 5.1.2 Número de casos diagnosticados

Na análise retrospectiva dos históricos referentes aos casos de botulismo pode ser verificado que o número de animais acometidos pela doença é maior do que os materiais processados para o exame laboratorial, pois nos históricos é frequente a queixa de vários animais doentes, com os mesmos sinais clínicos, mas nem todos estes animais foram

necropsiados para diagnóstico laboratorial. O comparativo entre o número de casos analisados e número de animais doentes está discriminado na Figura 3. O número de animais mortos supostamente por botulismo totalizou 132 bovinos.



Figura 3 - Gráfico dos casos de botulismo registrados nos arquivos do Setor de Patologia Animal - CAV/UEDESC, no período compreendido entre 1987 a 2008, com comparativo entre número de animais doentes e número de animais necropsiados.

### 5.1.3 Época do ano

A distribuição quanto à época do ano que a doença ocorreu no Estado de Santa Catarina está ilustrada na Figura 4. Nela pode-se observar que a maioria dos casos ocorreu entre dezembro a abril, o que correspondeu à forma associada à deficiência de fósforo. O surto ocorrido em julho foi devido à forma de botulismo relacionada a alimentos contaminados e estava associado ao consumo de compostagem incompleta de carcaça de suínos e aves.

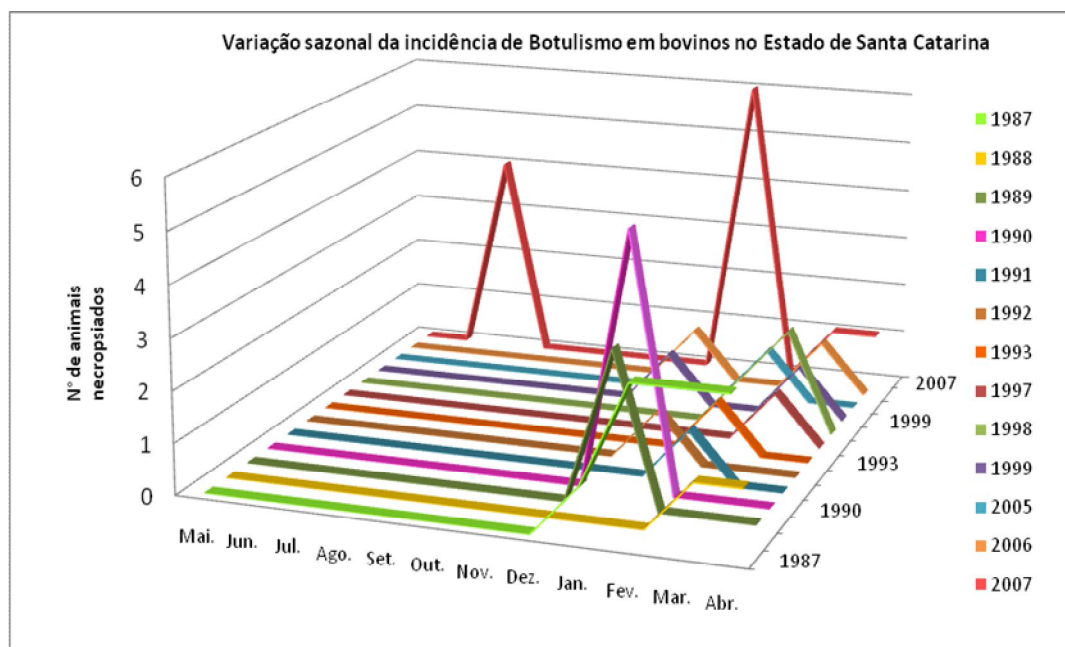


Figura 4 - Variação sazonal da ocorrência de botulismo no Estado de Santa Catarina registrada no Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC, no período compreendido entre 1987 a 2008.

#### 5.1.4 Categoria de animais envolvidos

Com referência a categoria dos animais envolvidos pode-se constatar que 36 animais acometidos (90%) foram fêmeas adultas, a maioria em lactação, três machos (7,5%) e um caso (2,5%) o sexo não foi informado.

#### 5.1.5 Distribuição quanto à fonte de intoxicação botulínica

Com base nos históricos dos materiais enviados e nos casos acompanhados os surtos foram agrupados em botulismo associado à deficiência de fósforo com 38 (95%) casos e na forma associada à ingestão de alimentos contaminados em dois (5%) casos. Os dados referentes à classificação estão sumarizados na Figura 5.

Os casos de botulismo associado à deficiência de fósforo ocorreram no Planalto Serrano e no município de Joinville e o surto associado à ingestão de alimentos contaminados ocorreu no município de Erval Velho.

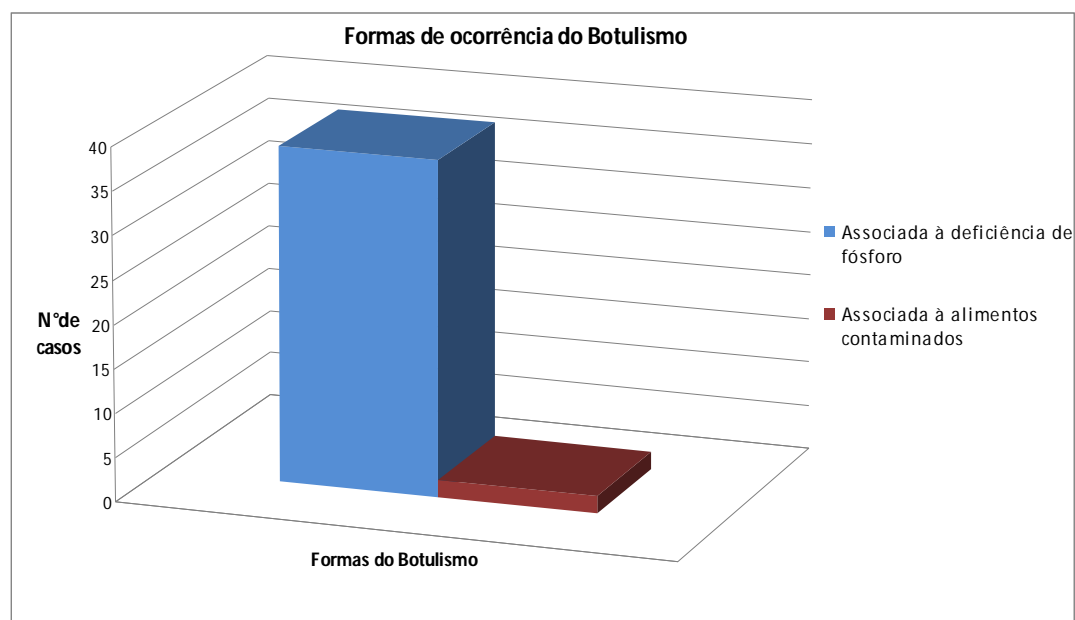


Figura 5 - Classificação dos surtos de botulismo no Estado de Santa Catarina registrados no Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC, no período compreendido entre 1987 a 2008.

#### 5.1.6 Sinais clínicos

Os sinais clínicos relatados e observados encontram-se na Tabela 1. De uma maneira geral, os sinais com maior frequência registrados foram à dificuldade de locomoção, andar rígido, paralisia dos membros posteriores, permanência em decúbito, diminuição do tônus da musculatura da língua, diminuição do tônus da cauda, estado mental alerta e alotriofagia.

Alotriofagia foi constatado em 23 casos (57,5%) dos 40 analisados, sendo que destes, 12 casos (30%) estiveram relacionados com a osteofagia e 11 casos (27,5%) associados à perversão do apetite com ingestão de pedras, plásticos e terra.

Tabela 1 - Frequência dos sinais clínicos, em ordem decrescente, registrados nos históricos dos casos de botulismo arquivados no Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC durante o período de 1987 a 2008

SINAIS CLÍNICOS	FREQUÊNCIA
Decúbito permanente	31
Osteofagia	23
Paralisia dos membros posteriores	19
Incoordenação motora	18
Diminuição do tônus da língua	11
Andar rígido	05
Percepção sensorial normal	05
Diminuição do tônus da cauda	04
Incapacidade de levantar	04
Diminuição do tônus da musculatura dos membros	03
Perda da sensibilidade dos membros	02
Dificuldade de apoiar os membros anteriores	01
Dificuldade respiratória	01
Diminuição do apetite	01
Salivação	01

#### 5.1.7 Lesões macroscópicas e histológicas

Os principais achados de necropsia estão ilustrados na Tabela 2. Estes revelaram a ocorrência de corpos estranhos nos pré-estômagos em 12 casos analisados. Também foi registrada a ocorrência de lesões inespecíficas, tais como: equimoses no epicárdio em 11 casos, lesões de decúbito em quatro casos e avermelhamento na mucosa intestinal em 15 casos.

Nos exames histológicos 30 casos não apresentaram lesões histológicas e em seis houveram lesões inespecíficas, caracterizadas por satelitose (dois casos) no sistema nervoso central, edema de submucosa do rúmen, infiltrado mononuclear na mucosa intestinal, hemossiderose no baço e mineralização de túbulos renais (um caso cada).



Tabela 2 - Frequência dos achados de necropsia em casos de botulismo registrados no Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC, durante o período de 1987 a 2008

ACHADOS DE NECROPSIA	FREQUÊNCIA
Avermelhamento na mucosa intestinal	15
Corpo estranho no rúmen/retículo (ossos, plásticos, pedras)	12
Epicárdio com equimoses	11
Ressecamento do conteúdo dos pré-estômagos e intestino	04
Lesões de decúbito (edema e necrose muscular)	04
Ausência de lesões	10

### 5.1.8 Visitas às propriedades rurais

#### 5.1.8.1 Caracterização da propriedade

Em decorrência dos surtos de botulismo se restringiu a região do Planalto Serrano, no município de Lages, propriedades dessa região foram visitadas para a realização de levantamentos sobre as condições de manejo e as práticas sanitárias adotadas nos seus sistemas de produção.

As fazendas caracterizam-se por extensas áreas de campo nativo, dedicadas à criação extensiva de bovinos de corte (Figura 6 A e B).

A inspeção dos campos era realizada apenas uma vez por semana ou no máximo em dias alternados. Os locais para o fornecimento do sal mineral, quando existentes, eram formados por cochos de madeira descobertos espalhados aleatoriamente nas pastagens, não respeitando dimensões e nem número adequados ao total de animais do rebanho (Figura 7 A, B e C). Em algumas propriedades foram observados cochos cobertos, porém os cochos também não respeitavam as dimensões mínimas necessárias, conforme o número de animais (Figura 7 A).

A alimentação dos animais era baseada em campo nativo. A maioria das propriedades não fornecia sal mineral aos animais, muito das propriedades forneciam apenas sal comum (NaCl).

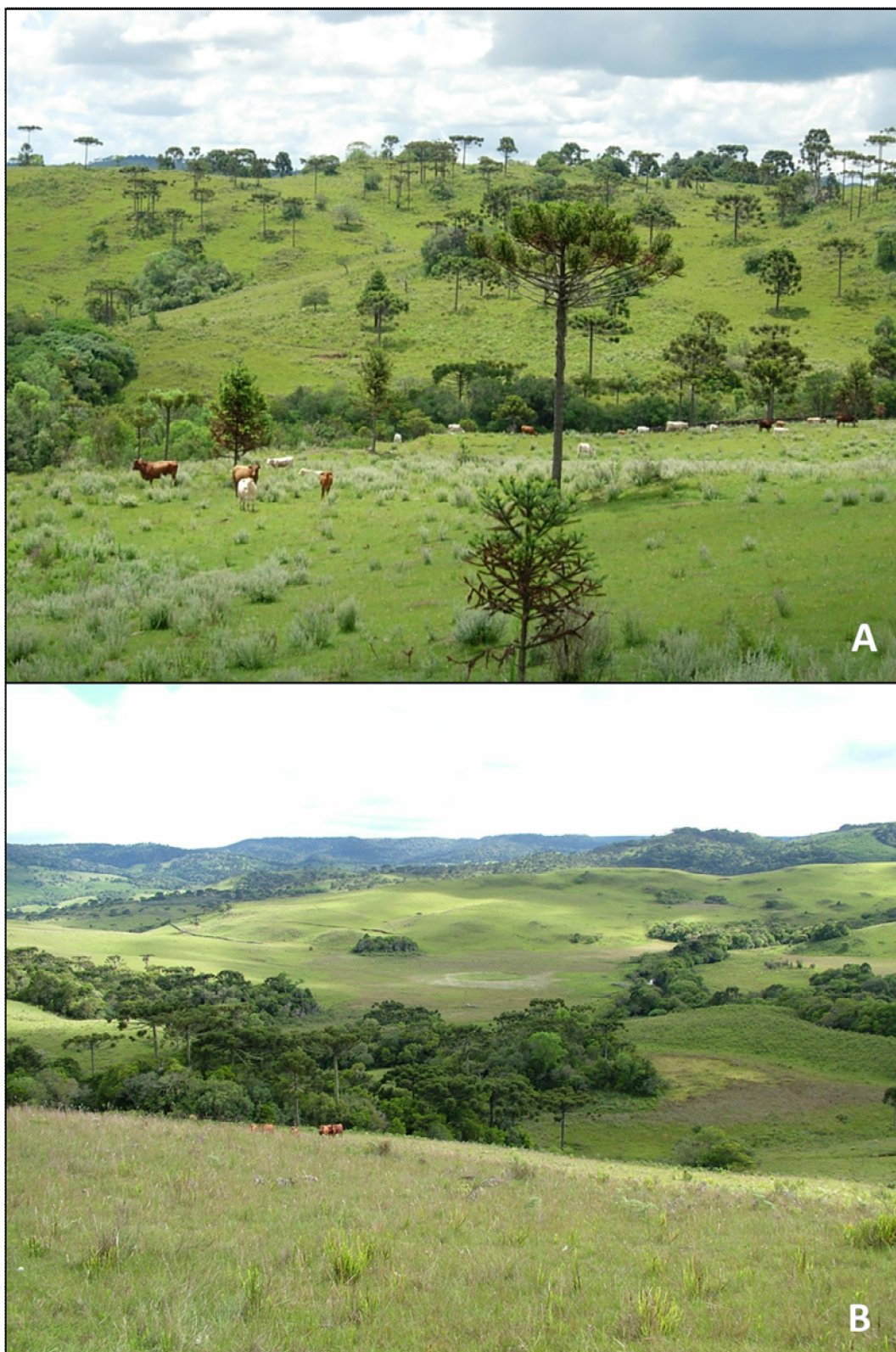


Figura 6 - A e B – Rebanho de bovino de corte nos campos nativos do Planalto Serrano Catarinense.





Figura 7 - Propriedades no município de Lages, SC. A - Cocho de madeira coberto utilizado para o fornecimento de sal mineral aos bovinos, com desproporção entre tamanho de cocho e número de animais. B e C- Cochos de madeira descobertos utilizados para o fornecimento de sal mineral.

Foi possível verificar várias carcaças de bovinos mortos em diferentes graus de decomposição nas pastagens ou mesmo restos de ossos espalhados pelos campos, alguns dos quais com sinais de terem sido mastigados ou roídos (Figura 8 A, B e C).

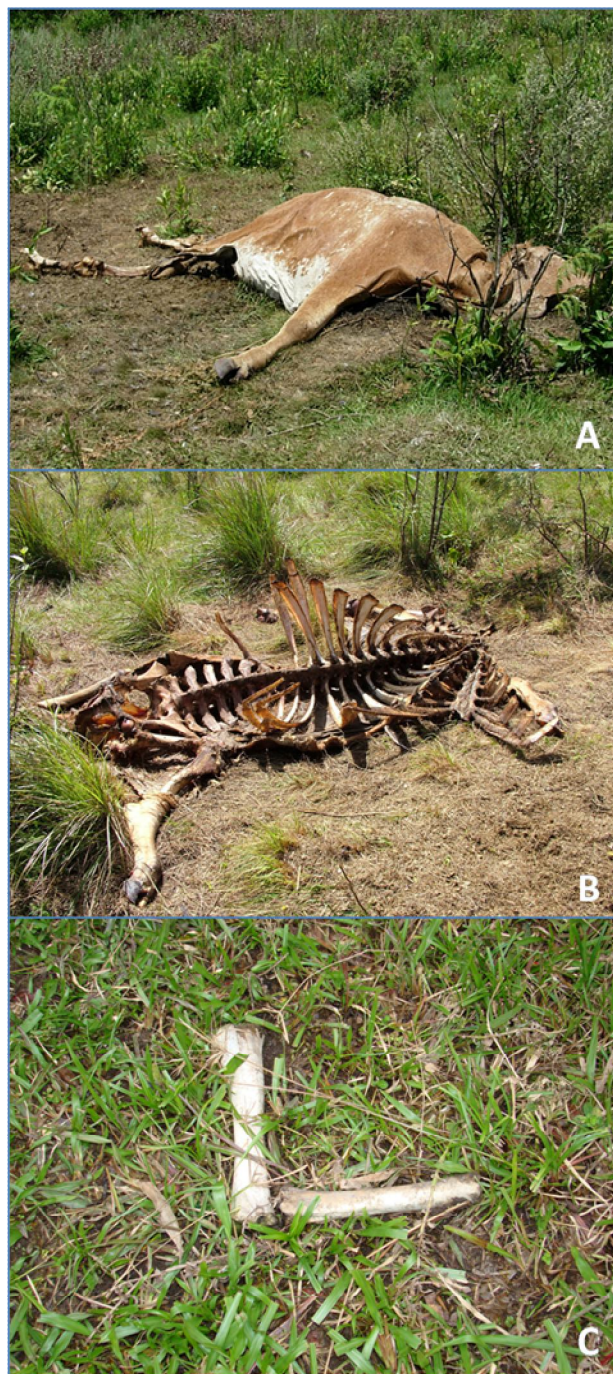


Figura 8 - Propriedades do Planalto Serrano Catarinense: A e B - Carcaças de bovinos em diferentes estágios de decomposição. C - Ossos espalhados pelas propriedades.

Ainda durante a visita pode-se observar a perversão dos hábitos alimentares dos bovinos sendo registrados com frequência animais com ossos na boca (Figura 9 A e B) e ingerindo terra. Na maioria dos casos, os animais observados com alotriofagia eram fêmeas novilhas e adultas.





Figura 9 - A e B - Bovinos com osteofagia em campos nativos, Planalto Serrano Catarinense.

## 5.2 ACOMPANHAMENTO DE CASOS CLÍNICOS DE BOTULISMO

Durante o período compreendido entre os anos de 2006 a 2008 foi possível o acompanhamento de oito surtos de botulismo. Destes, sete ocorreram na região do Planalto Serrano Catarinense, sendo três surtos no município de Lages, na região de Coxilha Rica, um

surto em cada município de Campo Belo do Sul, Correia Pinto e Ponte Alta. Também foi acompanhado um surto no Oeste Catarinense, no município de Erval Velho.

#### 5.2.1 Surtos acompanhados no período de 2006 a 2008.

##### 5.2.1.1 Primeiro surto

Este surto ocorreu na cidade de Correia Pinto, no Planalto Serrano Catarinense. O caso aconteceu em março de 2006. O animal acometido era um bovino, fêmea com quatro anos. Segundo o proprietário ocorreram mortes semelhantes anteriormente, chegando a morrer mais de 20 bovinos em um ano. Nos últimos seis meses já morreram três vacas com os mesmos sinais clínicos. Os animais ficavam prostrados, com incoordenação motora e normalmente eram encontrados em decúbito. A morte ocorria em torno de 48 horas. A vaca encontrava-se em decúbito esternal, ficando com a cabeça voltada para o flanco. No exame clínico observou-se que o animal apresentava diminuição do tônus da língua, flacidez muscular, paralisia dos membros posteriores e permanecia em alerta (Figura 10). Após o exame clínico, o animal foi eutanasiado para realização da necropsia. A necropsia observou-se apenas uma leve ascite.



Figura 10 - Bovino de corte, fêmea, adulta com botulismo. Animal em decúbito esternal, com incapacidade de retrain a língua após tracionada.

#### 5.2.1.2 Segundo surto

Este surto de botulismo ocorreu na região de Coxilha Rica, interior do município de Lages. A propriedade possui criação extensiva de bovinos em pastagens constituídas apenas de campo nativo. Na propriedade há histórico de ocorrência de osteofagia e relatos de animais encontrados em decúbito esternal, seguido de morte.

Os casos acompanhados ocorreram no final de dezembro de 2006 e até janeiro de 2007. Neste surto foi acometido um total de oito animais, sendo que destes, quatro foram necropsiados. Todos os bovinos que morreram eram vacas adultas, com terneiro ao pé e que se alimentavam de campo nativo, não recebiam suplementação mineral e não eram vacinados contra o botulismo. Sete eram animais mestiços e um bovino era pardo suíço.

Duas vacas, uma mestiça e uma pardo suíça, foram observadas em decúbito esternal com paralisia dos membros pélvicos, sendo posteriormente encontrados mortos e necropsiados. Mais dois animais foram trazidos Setor de Patologia, para acompanhamento da evolução clínica e realização de necropsia. Um chegou morto e outro foi acompanhado até a morte. O animal vivo chegou ao laboratório, em decúbito esternal e permaneceu assim por dois dias. No exame clínico observou-se que o animal apresentava leve dificuldade respiratória, diminuição do tônus da língua e da cauda, flacidez muscular, paralisia dos membros posteriores. Permanecia frequentemente com a cabeça voltada para o flanco. Ao tracionar a língua, esta demorava alguns minutos para retornar a posição inicial (Figura 11 A). Ainda foi observado diminuição dos movimentos ruminais e hipotermia. No final do segundo dia, o animal foi encontrado em decúbito lateral, morrendo em poucas horas. Nas necropsias não foram encontradas lesões, apenas observou-se em um dos animais, fragmento ósseo no retículo (Figura 11 B).

#### 5.2.1.3 Terceiro surto

Este terceiro surto de botulismo também ocorreu na região de Coxilha Rica, no município de Lages. Os casos acompanhados ocorreram em janeiro de 2007. A propriedade possui criação extensiva de bovinos de corte em campo nativo. Neste surto foram acometidos quatro animais, sendo que destes, três foram necropsiados. Todos os bovinos que morreram eram vacas adultas, mestiças e com terneiro ao pé. Os animais não eram vacinados contra o



botulismo e não recebiam suplementação mineral. Os animais da propriedade possuem o hábito de roerem ossos.



Figura 11 - Bovino de corte, fêmea, com botulismo. A - Animal em decúbito esternal, cabeça voltada para o flanco esquerdo, exposição da língua após tração. B - Fragmento ósseo no retículo (círculo).

Um animal foi encontrado morto e necropsiado pelo veterinário da propriedade. Dois animais foram vistos arrepiados, sendo encontradas em decúbito esternal no dia seguinte. Após dois dias de decúbito, as vacas foram encontradas mortas. No exame de necropsia dos



animais não foram observadas lesões macroscópicas. No entanto, em uma vaca, foram encontrados pequenos fragmentos de osso no retículo.

#### 5.2.1.4 Quarto surto

Este surto ocorreu na cidade de Campo Belo do Sul, no Planalto Serrano Catarinense. A propriedade possui criação extensiva de bovinos. O caso acompanhado ocorreu no início de março de 2007. O animal era um bovino, fêmea adulta e mestiça.

Na primeira visita à propriedade, o animal encontrava-se em decúbito esternal e percepção sensorial normal. Alimentava-se e bebia água normalmente, porém não conseguia se levantar. Os sinais clínicos consistiam em paralisia dos membros posteriores e ausência do reflexo anal e da cauda. Os parâmetros clínicos (frequência cardíaca e respiratória, movimentos ruminais, temperatura e coloração das mucosas) encontravam-se todos normais. Na segunda visita, foi realizada a necropsia do animal. Este permaneceu cinco dias em decúbito. No exame de necropsia foi observado áreas de hemorragia na musculatura da região do peito, ceco conteúdo seco e mucosa intestinal com sufusões. Nos demais órgãos não foram observados alterações macroscópicas.

#### 5.2.1.5 Quinto surto

Este surto ocorreu na cidade de Capão Alto, também localizada no Planalto Serrano Catarinense, em abril de 2007. De um total de 400 animais, dez adoeceram, apresentando decúbito seguido de morte. Um animal foi necropsiado. Segundo o proprietário, este tipo de problema só ocorreu com vacas que tinham terneiro ao pé. Somente as vacas com terneiro ao pé adoeceram.

O exame clínico e a necropsia do animal acometido foram realizados na propriedade. O bovino foi encontrado em decúbito e estava consciente. Alimentava-se e bebia água normalmente, apresentava paralisia dos membros posteriores, porém mantinha o tônus da língua após retração.

No exame de necropsia pode ser verificado edema na região peitoral e leve edema na região da musculatura dos membros posteriores. No restante não foram observadas lesões macroscópicas.

#### 5.2.1.6 Sexto surto

O sexto surto ocorreu na cidade de Ponte Alta, no Planalto Serrano Catarinense, em junho de 2007. Segundo relato do proprietário casos semelhantes ocorreram nos anos anteriores, sendo que em 2005 e 2006 foram acometidos três animais em cada ano. Até junho de 2007 de 25 animais dois bovinos já morreram. Os animais alimentavam-se apenas de campo nativo e recebiam sal comum (cloreto de sódio). Nunca receberam sal mineral para bovinos. Todos os animais acometidos manifestavam os mesmos sinais clínicos, caracterizados por incoordenação motora, perda dos movimentos, decúbito esternal, evoluindo para decúbito lateral e morte. Um animal permaneceu em decúbito por um período de 30 dias.

O animal acompanhado era um bovino, fêmea da raça Gir com seis anos de idade. O animal apresentava paralisia flácida dos membros anteriores e posteriores, porém respondia ao reflexo de dor e apresentava o tônus da musculatura da língua e do ânus. O animal foi eutanasiado. Na necropsia não foram observadas lesões significativas.

#### 5.2.1.7 Sétimo surto

Este sétimo caso de botulismo ocorreu no município de Erval Velho, no oeste de Santa Catarina, em uma propriedade de gado leiteiro. Os casos acompanhados ocorreram em julho de 2007. O rebanho era constituído de 30 animais, destes seis adoeceram e todos morreram. Os animais foram acompanhados clinicamente, sendo realizado a necropsia de um dos bovinos.

Os animais acometidos pastejavam em pastagem de aveia e recebiam concentrado no cocho. A pastagem era dividida em pequenos piquetes por cerca elétrica e, dois meses após o plantio da aveia, compostagem incompleta de carcaças de suínos e aves foi sobreposta em alguns deles (Figura 12).

Os animais que estavam nesses piquetes, adoeceram em dois a três dias após a distribuição da compostagem. A doença ocorreu naqueles piquetes onde a compostagem foi espalhada, não sendo verificada nos demais. Na observação da pastagem constatou-se que havia boa oferta de pasto verde e também restos de carcaças de aves e suínos, não totalmente decompostas (Figura 13 A e B).



Figura 12 - Pastagem de aveia usada na alimentação de bovinos leiteiros, onde foi espalhado compostagem incompleta de carcaças de suínos e aves. No detalhe restos ósseos na pastagem. Erval Velho, Oeste Catarinense.

Segundo o proprietário, a parte superior da composteira era retirada sempre que preciso, não sendo levado em consideração o tempo necessário para decomposição das carcaças. Os animais acometidos apresentavam dificuldade de locomoção, paralisia progressiva, iniciando nos membros posteriores e atingindo os membros anteriores e decúbito lateral, permanecendo conscientes, mas com diminuição do tônus da língua e cauda (Figura 14 A e B).

O animal que foi eutanasiado para necropsia era um bovino, fêmea, adulto da raça holandês preto e branco.





Figura 13 - Pastagem de aveia contaminada com carcaças de suínos e aves em estado incompleto de decomposição. A – Carcaça de suíno. B – Carcaça de frango.





Figura 14 - Vacas leiteiras com botulismo. A – Animais adultos em decúbito esternal, com incapacidade de levantar. B – Bovino com paralisia flácida de membros posteriores e cabeça voltada para o flanco esquerdo.

#### 5.2.1.8 Oitavo surto

Este surto ocorreu em uma propriedade localizada na região da Coxilha Rica. A propriedade possui criação extensiva de bovinos de corte em pastagens constituídas apenas de campo nativo. Os casos relatados pelo proprietário começaram no início de setembro até final de dezembro de 2008. Todos os bovinos acometidos eram vacas adultas, acima de cinco anos, que estavam em gestação ou em lactação com terneiro ao pé e que não eram vacinados contra

o botulismo. A suplementação mineral era fornecida irregularmente aos animais, em cochos de madeira descobertos.

A propriedade não tem funcionário e os animais eram observados somente no final de semana. Segundo relato do proprietário da fazenda, os animais eram vistos roendo ossos frequentemente, inclusive ingerindo restos dos cadáveres dos bovinos mortos em decomposição. Os animais acometidos apresentavam incoordenação motora, dificuldade de locomoção e posteriormente foram encontrados em decúbito esternal. Na inspeção subsequente, a maioria dos animais já eram encontrada morta. A doença só era verificada nos piquetes da propriedade em que há carcaças em decomposição.

Em visita à propriedade podem-se observar restos de carcaças em diferentes estágios de decomposição e restos ósseos espalhados pelas pastagens, muitos dos quais distantes das áreas em que os animais haviam morrido (Figura 8 A, B e C).

Neste surto de 70 bovinos, seis animais adoeceram e morreram, sendo que destes nenhum foi necropsiado, pois se encontravam em estado avançado de decomposição e, muitas vezes, restando apenas ossos. Foi coletado amostras de solo abaixo dos cadáveres e amostras de ossos de um animal em decomposição para realização indireta do teste de bioensaio e soroneutralização (Figura 15).

Durante a visita o proprietário foi orientado para vacinar os animais, fornecer suplementação mineral e queimar os ossos. Após a primeira dose da vacina, um animal adoeceu e morreu. Após a segunda dose não foram mais observados casos de botulismo na propriedade.

### 5.2.2 Coeficientes de mortalidade, morbidade e letalidade

A letalidade de todos os surtos foi de 100%. A mortalidade de cada surto está discriminada na Tabela 3.



Figura 15 - Carcaça em decomposição. Área de coleta de solo e ossos da carcaça para cultivo microbiológico, Lages, SC.

Tabela 3 - Taxas de mortalidade, morbidade e letalidade referentes aos surtos acompanhados de 2006 a 2008 pelo Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC

Surto	Animais			Taxa de		
	Total	Doentes	Mortos	Mortalidade	Morbidade	Letalidade
1	130	4	4	3,07%	3,07%	100%
2	300	8	8	2,66%	2,66%	100%
3	180	4	4	2,22%	2,22%	100%
4	340	1	1	0,29%	0,29%	100%
5	400	10	10	2,50%	2,50%	100%
6	25	3	3	12,00%	12,00%	100%
7	30	6	6	20,00%	20,00%	100%
8	70	6	6	8,57%	8,57%	100%

### 5.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

#### 5.3.1 Exame histológico

Nos surtos classificados como primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto e sexto não foi observado nenhuma alteração microscópica. No entanto, no exame histológico do sétimo surto pode ser verificado, no sistema nervoso central, figuras de satelitose de intensidade moderada e edema acentuado difuso na camada muscular do rúmen.

#### 5.3.2. Exame microbiológico

O resultado do teste de bioensaio em camundongo encontra-se na Tabela 4. O resultado da soroneutralização em camundongo para tipificação da toxina botulínica dos materiais positivos encontra-se na Tabela 5.

Tabela 4 - Resultados do teste de bioensaio em camundongo dos materiais coletados nos surtos acompanhados durante os anos de 2006 e 2008 pelo Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC

Material	Surto	Fígado	Conteúdo		Amostras	
			Ruminal	Intestinal	Solo	Osso
<b>Bovino 1</b>	Nº 2	Negativo	NA*	Negativo	NC**	NC
<b>Bovino 2</b>	Nº 2	Negativo	NA	Negativo	NC	NC
<b>Bovino 3</b>	Nº 2	Negativo	NA	<b>Positivo</b>	NC	NC
<b>Bovino 4</b>	Nº 3	Negativo	NA	Negativo	NC	NC
<b>Bovino 5</b>	Nº 3	Negativo	NA	Negativo	NC	NC
<b>Bovino 6</b>	Nº 4	Negativo	Negativo	NA	NC	NC
<b>Bovino 7</b>	Nº 5	NA	Negativo	Negativo	NC	NC
<b>Bovino 8</b>	Nº 6	NA	NA	Negativo	NC	NC
<b>Bovino 9</b>	Nº 7	Negativo	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<b>Amostra 10</b>	Nº 8	NC	NC	NC	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>

\*NA: material não apropriado para análise

\*\*NC: não coletado



Tabela 5- Resultados do teste de soroneutralização em camundongo para tipificação da toxina botulínica dos materiais coletados nos surtos acompanhados durante os anos de 2006 e 2008 pelo Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC

Material	Surto	Fígado	Conteúdo		Amostras	
			Ruminal	Intestinal	Solo	Osso
<b>Bovino 3</b>	Nº 2	-*	-	<b>Tipo C</b>	-	-
<b>Bovino 9</b>	Nº 7	-	-	-	<b>Tipo D</b>	<b>Tipo D</b>
<b>Amostra 10</b>	Nº 8	-	-	-	<b>Tipo D</b>	<b>Tipo C</b>

\* Ausência de resultado

Vale ressaltar que para realização da tipificação da toxina botulínica dos fragmentos ósseos da compostagem do surto 07 e das amostras de solos dos surtos 07 e 08, foram realizadas várias diluições do sobrenadante obtido a partir do cultivo bacteriano dos materiais em meio de Wright (carne moída cozida), devido à concentração da toxina ser muito elevada, matando todos os camundongos soroneutralizados com as antitoxinas C e D. O resultado 05, onde os resultados positivos significam que os camundongos soroneutralizados desenvolveram os sinais clínicos e morreram, impossibilitando a determinação da toxina e os animais negativos correspondem aos camundongos soroneutralizados que não morreram, possibilitando, assim, a tipificação da toxina botulínica.

Tabela 6 - Resultados do teste de soroneutralização em camundongo, após diluições, para tipificação da toxina botulínica dos materiais coletados nos surtos acompanhados durante os anos de 2006 e 2008 pelo Setor de Patologia Animal - CAV/UDESC

RESULTADOS					
DILUIÇÕES	1:10	1:100	1:1000	1:10000	Tipificação
<b>Surto 07: solo</b>	Positivo <sup>1</sup>	Positivo	Positivo	Negativo	<b>Tipo D</b>
<b>Surto 07: osso</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	<b>Tipo D</b>
<b>Surto 08: solo</b>	Positivo	Positivo	Negativo <sup>2</sup>	Negativo	<b>Tipo D</b>

<sup>1</sup> Camundongo soroneutralizado com antitoxina C e D que morreu.

<sup>2</sup> Camundongo soroneutralizado com antitoxina C e D que não morreu.

Os camundongos submetidos ao bioensaio com materiais positivos desenvolveram os sinais clínicos semelhantes ao botulismo, que se caracterizaram por dificuldade respiratória, incoordenação motora, abdômen cintado, dificuldade de locomoção, paralisia dos membros posteriores, asfixia, evoluindo para morte (Figura 16 A e B).

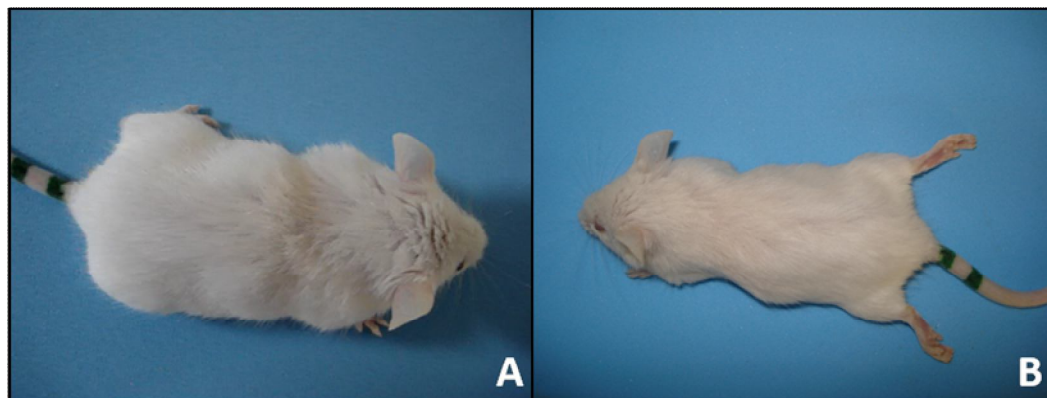


Figura 16 - Camundongos submetidos ao teste de bioensaio e soroneutralização. A – Camundongo com acinturamento do abdômen. B – Paralisia flácida dos membros posteriores.

As colônias bacterianas obtidas dos materiais (fragmentos ósseos, solo e amostras da compostagem) cultivados em meio de Wright (carne moída cozida) que cresceram na placa de ágar sangue foram submetidas à coloração de Gram para a verificação da bactéria. O *C. botulinum* apareceu como bastonetes gram positivos, alongados e cilíndricos, apresentando diferentes tamanhos com a presença de esporos subterminais e livres (Figura 17)

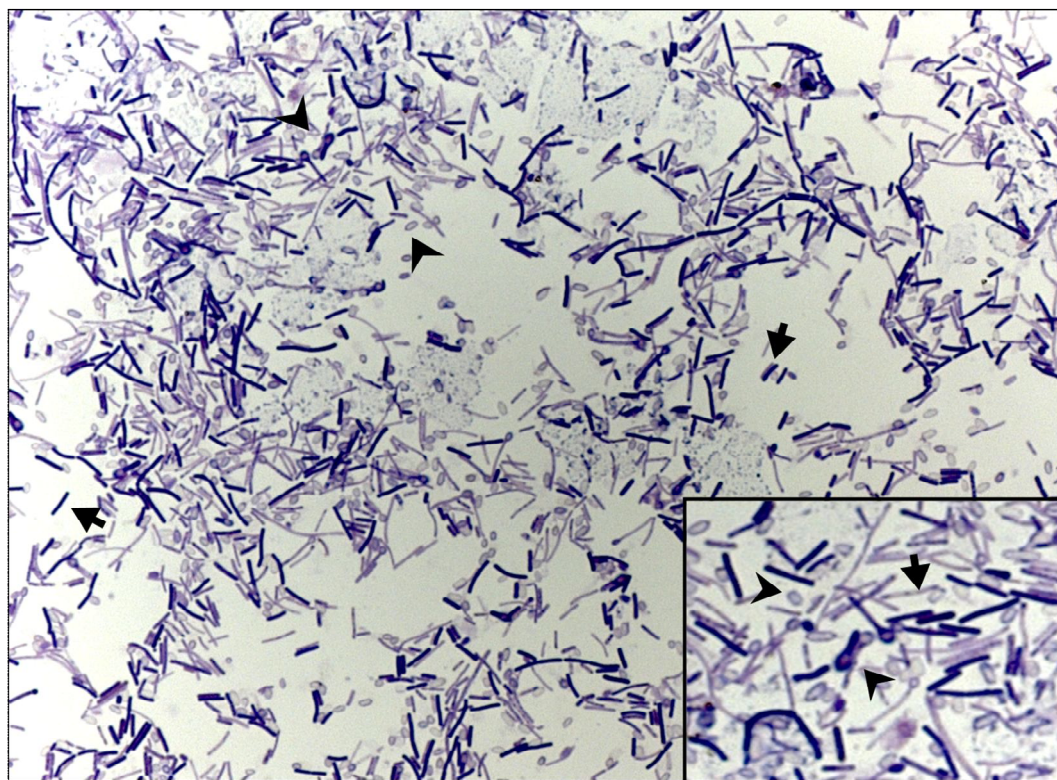


Figura 17 - Formas evolutivas do *C. botulinum*. No detalhe, bastonetes (seta) de *C. botulinum* com esporos subterminais e livres (ponta de seta). (Coloração de Gram, objetiva 100x).

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi registrada a ocorrência de surtos de mortalidade em bovinos com paralisia flácida progressiva que, na necropsia e nos exames histológicos, não mostraram alterações significativas, caracterizando o quadro de botulismo. O quadro clínico lesional observado é idêntico ao descrito nas intoxicações por botulismo por Tokarnia et al., (1970a); Langenegger, (1981); Langenegger, Döbereiner & Tokarnia, (1983); Riet-Correia et al., (1983); Stöber, (1984); Turnes, Langenegger & Scarsi, (1984); Döbereiner et al., (1992); Kriek & Odendaal, (1994); Dutra & Döbereiner, (1995); Lisboa et al., (1996); Souza, Marques & Dutra, (1996); Souza, Marques & Dutra, (1997); Dutra, (2001); Dutra et al., (2001); Stöber, (2002); Dutra et al., (2005); Lemos, (2005); Veronezi et al., (2007); Veronezi et al., (2009).

Em Santa Catarina, o botulismo ocorreu na forma associada à deficiência de fósforo e na forma associada à ingestão de alimentos contaminados, sendo a forma associada à deficiência de fósforo a mais importante no Estado e responsável pela mortalidade de bovinos no planalto serrano nos meses de dezembro a abril.

A letalidade de todos os casos acompanhados foi de 100%, semelhantes ao observado por Dutra (2001) e Lemos (2005). As taxas de morbidade e mortalidade não puderam ser calculadas nos casos do levantamento epidemiológico, pois o número total de cabeças nem sempre era relatado em todos os históricos, mesmo assim pode-se constar que as taxas de morbidade e mortalidade estavam em torno de 2%. Nos surtos acompanhados de 2006 a 2008 a mortalidade variou de 0,29% a 12% na forma de botulismo associada à deficiência de fósforo e de 20% na forma associada a alimento contaminado.

A forma associada à deficiência de fósforo ocorreu principalmente em criações extensivas de bovinos de corte, mantidos apenas em pastagens de campo nativo, do Planalto Serrano Catarinense. Essas regiões são conhecidas por apresentarem relativa deficiência de fósforo no solo e nas pastagens (Embrapa, 2001). Os animais não recebiam suplementação a cocho, ou, se recebiam, era irregular. A doença ocorreu, principalmente, nos meses de dezembro a abril. Os mesmos fatores epidemiológicos também foram observados por Tokarnia et al., (1970a), Langenegger, Döbereiner & Tokarnia, (1983), Langenegger &

Döbereiner, (1988), Dutra & Döbereiner, (1993), Lisboa et al., (1966) e Dutra, (2001) em surtos de botulismo associado a deficiência de fósforo.

Nessa região é comum a queima das pastagens nos meses de julho e agosto, o que determina o rebrote das pastagens nos meses de setembro e outubro, época que coincide com o período de parição. Nessa época as pastagens têm maior oferta de alimento e maior disponibilidade de fósforo. Com a chegada do verão, nos meses de dezembro a fevereiro a pastagem está madura, com menores teores de fósforo, justamente quando a fêmea tem maior exigência nutricional, pois esta no período de lactação.

A necessidade de fósforo manifesta-se mais acentuadamente nas vacas em gestação ou em lactação. É justamente nesta ocasião que se acentua a deficiência de fósforo, a tal ponto que o animal sente a necessidade de supri-la buscando outras fontes, tais como ossos de animais mortos (osteofagia), assim como a procura de outros materiais, diferentes dos habituais a sua alimentação (alotriofagia), como pedras, terras ou plástico (TOKARNIA et al., 1970a; TOKARNIA et al., 1970; LANGENEGGER, 1981; LANGENEGGER et al., 1983; DUTRA & DÖBEREINER, 1995, TOKARNIA, DOBEREINER & PEIXOTO, 2000). No presente estudo, o hábito de alotriofagia e osteofagia foi constatado em visitas as propriedades e nos históricos clínicos. A osteofagia é um hábito característico da deficiência de fósforo, no entanto a ingestão de terra pode estar associada à deficiência de outros minerais como cobalto e cloreto de sódio (RADOSTITS et. al, 2002).

Em relação à categoria dos animais acometidos, pode-se verificar que a maioria dos casos ocorreu em vacas, que estavam em gestação ou em lactação. Estas observações estão de acordo com Langenegger & Döbereiner, (1980); Dutra (1991); Döbereiner et al., (1992), Ortolani, (1993), Lisboa et al., (1994), Kriek & Odendaal, (1994) e Dutra (2001), os quais afirmam que estas categorias de animais são as que mais frequentemente manifestaram osteofagia, quando submetidas a dietas pobres em fósforo.

Outro componente importante para a ocorrência de botulismo é a intensidade da contaminação ambiental pelo *C. botulinum* (TOKARNIA et al., 1970a; LANGENEGGER et al., 1983; LANGENEGGER & DÖBEREINER, 1988; DÖBEREINER et al., 1992; DUTRA, 2001), ampliada pela presença de carcaças de bovinos, supostamente mortos pelo botulismo, decompostos nas pastagens (SOUZA, 1985; RIBAS et al., 1994). Nas propriedades visitadas era frequente a observação de carcaças em decomposição expostas nas pastagens, facilitando assim, a contaminação do meio.

Nos 34 surtos relacionados à osteofagia, verificou-se à existência de condições favoráveis à ocorrência do botulismo. Pode ser observado que a prática de suplementação

mineral, eliminação de carcaças e a vacinação dos animais contra o botulismo nas propriedades são práticas que, na maioria dos casos, não eram realizadas e quando eram feitas, apresentaram irregularidades, sendo realizada por alguns anos e após o desaparecimento da doença deixadas de serem praticadas. Esses fatores foram descritos por Langenegger & Döbereiner, (1988), Döbereiner et al., (1992), Dutra, Weiss & Döbereiner, (1992) e Dutra, (2001) que salientam que a ocorrência do botulismo em bovinos, associado à deficiência de fósforo, no Brasil, nas regiões do cerrado e campos naturais, é determinada pela inadequada suplementação mineral, inadequada remoção de carcaças contaminadas nos locais de ocorrência da doença e não vacinação contra botulismo.

Durante as visitas nas propriedades, além das carcaças expostas, pode se observar a ineficiência da suplementação mineral, que ou não era realizada, devido à ausência de cochos ou quando presentes eram cochos descobertos e/ou o número era insuficiente em relação à quantidade de bovinos existentes no rebanho.

Outro fator epidemiológico também verificado nas propriedades foi a presença de animais silvestres como urubus (*Coragyps atratus*) e graxaim (*Cerdocyon thous*) que contribuem para a disseminação do *C. botulinum* de um piquete, ao outro, ou de uma propriedade a outra, pois estes animais transportam ou mesmo desenterram os restos dos cadáveres, deixando-os expostos nas pastagens, sendo fontes potenciais de contaminação (DUTRA, 2001).

No levantamento dos casos de botulismo pode se observar a ocorrência de pico da doença no ano de 1987, seguida de diminuição do número de casos nos anos subsequentes. Isso ocorreu devido a um trabalho de extensão, realizado pelo Setor de Patologia Animal CAV/UDESC, que consistia em levantamento de casos, realização de necropsia e diagnóstico, além da divulgação de práticas de manejo, como suplementação mineral, remoção de carcaças e vacinação, o que contribuíram para a diminuição do número de casos.

Um segundo pico de casos foi observado no ano de 2007 e alguns fatores contribuíram diretamente nesse aumento: a negligência dos proprietários com relação ao controle dos fatores epidemiológicos associados ao botulismo, como vacinação, destino das carcaças no campo e principalmente a suspensão da suplementação mineral dos animais, sendo esse último item agravado pela alta no preço. Durante esse ano e o ano subsequente novamente os proprietários foram orientados para realizarem a vacinação. Segundo as agropecuárias da região, o ano de 2007 foi o ano que ocorreu maior número de vendas de vacinas contra botulismo na região (BORGES, 2009. Comunicação pessoal). Este fato contribuiu significativamente e para a diminuição da doença no ano de 2008.

A queda no número de casos de botulismo após a vacinação é um fator que pode ser útil no diagnóstico de botulismo endêmico, pois em rebanhos vacinados há uma drástica diminuição do número de casos afetados em rebanhos que receberam a primeira e a segunda vacinação em um período de intervalo de um mês cada (DUTRA & DÖBEREINER, 1996; KRIEK & ODENDAAL, 1994; LOBATO et al., 1999; DUTRA, 2001; FONSECA, 2001; CURCI et al., 2008). A diminuição do número de casos após a vacinação pode ser observada no monitoramento dos animais do surto oito, onde, antes da vacinação adoeceram cinco animais, após a primeira vacinação apenas um animal adoeceu e após a segunda dose da vacina, não houve mais animais doentes.

Quanto à forma do botulismo associada à ingestão de alimentos contaminados, essa foi associada à presença de carcaças de suínos e aves não totalmente decompostas, utilizada como adubo em pastagens de aveia, sendo a possível fonte de contaminação do alimento responsável pela intoxicação botulínica. A compostagem é um meio eficaz de inativação de agentes infecciosos, desde que respeitado o tempo mínimo para decomposição completa (CURCI et al., 2007), o que não foi verificado nesse caso. Casos semelhantes foram descritos na Inglaterra, com cama de frango espalhada em uma parte do pasto utilizado pelos animais (CLEGG et al., 1985) e na Irlanda do Norte, com utilização da cama de frango como fertilizante do pasto, contendo carcaças de aves em decomposição (MCLLROY, MCCRACKEN & HUEY, 1987).

Os sinais clínicos observados nos casos associados à deficiência de fósforo e associado à ingestão de alimentos contaminados acompanhados, ou nos históricos dos materiais enviados estão de acordo com os descritos por Theiler & Robinson, (1927), Stöber, (1984), Stöber, (2002) e Dutra, (2001). A evolução clínica do quadro de intoxicação botulínica apresentou uma enorme variação com casos em que a morte ocorreu rapidamente, como pode ser observado no surto associado à utilização de compostagem incompleta para adubação das pastagens ou até 30 dias em casos associados à osteofagia.

A manifestação dos sinais clínicos e a evolução da doença é dose/toxina dependente, sendo que quanto maior a quantidade de toxina mais rápida é a evolução dos sinais clínicos e morte dos animais (SANTOS et al, 1993; KRIEK & ODEDAAL, 1994; ORTOLONI et al., 1996). É provável que no surto associado à ingestão de alimento contaminado a quantidade de toxina disponível fosse alta, pois os animais morreram em até quatro dias. Outro fator que corrobora para essa hipótese é a rápida evolução clínica e morte dos camundongos na prova de soroneutralização, do material isolado do surto, que foi inferior à uma hora.

Animais que apresentam o hábito de roer ossos acabam adquirindo a doença após a ingestão de material contaminado durante o pastejo e, geralmente, desenvolvem a forma subaguda ou a forma crônica da doença. Nessas condições raramente desenvolvem as formas mais agudas da doença (THEILER & ROBINSON, 1927; HENNING, 1956), podendo ser observados os animais clinicamente doentes.

Nos surtos associado à osteofagia, os animais foram encontrados em decúbito ou mortos no campo. Isso se deve, em parte, ao fato da doença ocorrer em propriedades com grandes extensões de terra, onde as inspeções dos campos são feitas apenas uma vez por semana ou no máximo em dias alternados.

O botulismo é caracterizado por ausência de lesões macroscópicas, visto que a toxina botulínica age na sinapse neuromuscular (HENNING, 1956; KRIEK & ODENDAAL, 1994). Nesse estudo, os achados de necropsia revelaram a ocorrência de lesões inespecíficas, muitas das quais associadas às condições em que os animais se encontravam como lesões de decúbito por tempo prolongado. Os achados de necropsia do presente trabalho são compatíveis com os observados por outros autores (HENNING, 1956; TRUEMAN et al., 1992; KRIEK & ODENDAAL, 1994; DUTRA, 2001; LEMOS et al., 2001; LEMOS, 2005) e possivelmente não tem relação direta com a ação neurotóxica da toxina botulínica.

Em 12 casos foram observados avermelhamento da mucosa intestinal que talvez possa ser determinada pela toxina tipo C<sub>2</sub>, produzida por cepas de *C. botulinum* tipo C, que embora não possua ação neurotóxica, pode causar acúmulo de fluido intestinal e aumento de permeabilidade vascular (SIMPSON, 1982; OHISHI & ODAGIRI, 1984; AKTORIES et al., 1986; HAUSCHILD, 1990).

Em quatro casos foi relatado o ressecamento do conteúdo dos pré-estômagos e intestino, lesão que pode estar relacionada com a desidratação devido ao decúbito e não acesso à água e, não necessariamente seja uma alteração específica da doença.

Na necropsia de dois bovinos foram observados fragmentos de ossos. Além disso, no levantamento epidemiológico 12 casos relataram a presença de corpo estranho no rúmen ou retículo (osso, plástico e pedra). Fragmentos de ossos podem ser encontrados no rúmen e retículo em alguns casos de botulismo (MENDEZ et al., 1987; RIET-CORREA et al., 1984). A presença de osso nos pré-estômagos é apenas uma evidência de osteofagia e não um dado conclusivo para o diagnóstico de botulismo, pois o animal pode desenvolver o hábito de mastigar ossos, sem necessariamente degluti-los. Outro ponto que deve ser levado em consideração é que não necessariamente o osso contenha a toxina botulínica.

No presente estudo não foi verificado lesões histológicas específicas. Porém as figuras de satelitose encontradas em duas amostras submetidas a exame histológico são possivelmente decorrentes de animais que permaneceram em decúbito por um período prolongado de tempo, não devendo ser levada em consideração como lesão primária associada ao botulismo. O mesmo é visto em casos de hipóxia, resultando no aumento numérico de células oligodendrogliais nas proximidades dos neurônios. A ausência de lesões histológicas está de acordo com a literatura (HENNING, 1956; TRUEMAN et al., 1992; KRIEK & ODENDAAL, 1994; DUTRA, 2001; LEMOS, 2005).

Os sinais clínicos, juntamente com o exame histológico, possibilitaram à exclusão de outras enfermidades, envolvendo o sistema nervoso e neuromuscular de bovinos, como raiva, a doença de aujeszky, listeriose, babesiose cerebral, intoxicação por chumbo, abscessos cerebrales, poliencefalomalácia, meningites bacterianas, linfossarcoma infiltrado no canal medular e miopatia nutricionais e tóxicas, pois apresentam lesões histológicas características.

Em Santa Catarina, para diagnóstico diferencial de botulismo, assume importância a raiva e a babesiose cerebral por serem as doenças mais comumente diagnosticadas com sinais neurológicos, linfossarcoma, quando infiltrado na medula espinhal e a intoxicação por plantas do gênero *Senna*.

Das sete amostras coletadas de animais clinicamente doentes, somente em um caso foi possível detectar a toxina botulínica de maneira direta. Segundo Smith (1977), a tentativa de detecção de toxina botulínica nos animais doentes ou mesmo mortos, apresenta dificuldade pelas características da ação da toxina e da susceptibilidade do bovino, pois uma vez atingido a sinapse neuromuscular a toxina perderia a atividade biológica, dificultando ou impossibilitando sua detecção. Dutra, (2001) em seu estudo verificou que a análise individual de amostras de fígado, conteúdo ruminal e intestinal além de soro sanguíneo apresentaram pequena contribuição para o estabelecimento do diagnóstico laboratorial do botulismo.

A sensibilidade epidemiológica da soroneutralização em camundongo, no diagnóstico laboratorial de botulismo em bovinos, em pelo menos uma das quatro amostras analisadas (fígado, conteúdo ruminal e intestinal e soro sanguíneo) é de apenas 43,4%, (DUTRA, 2001), apesar de o teste de bioensaio e soroneutralização em camundongo ser o teste mais sensível e específico para a detecção da toxina botulínica (TAKAHASHI, KAMEYMA & SAKAGUCHI, 1990).

Em surtos de botulismo, associados à osteofagia ou à ingestão de alimentos contaminados, a tentativa de detecção da toxina botulínica apresenta resultados bastante irregulares, quando se utilizam amostras de soro sanguíneo e vísceras de bovinos (CLEGG et



al., 1985; BALDASSI, 1986; THOMAS, 1991; BALDASSI et al., 1991; LOBATO, 1997), o mesmo ocorreu em animais intoxicados experimentalmente (COLBACHINI, SCHOCKEN-ITURRINO & MARQUES, 1999).

No presente estudo, o diagnóstico de botulismo no surto sete e oito foi indiretamente confirmada pela detecção da bactéria e suas toxinas, de amostras do solo e de fragmentos ósseos, conseguindo-se determinar que as toxinas presentes, foram do tipo C e D, visto que, dos materiais biológicos o resultado foi negativo no caso do surto sete e, que não foi possível, coletar material dos animais acometidos no surto oito. O teste indireto, também foi usado como método auxiliar de diagnóstico por Ribas et al., (1994) e Souza (1985). O simples isolamento do microorganismo tem valor epidemiológico questionável ou nulo, uma vez que somente a presença da carcaça contaminada não resulta na doença. No entanto é um indicador potencial de ocorrência da intoxicação diante da osteofagia, ao mesmo tempo em que, na ausência do microorganismo e de suas toxinas, a doença não ocorreria.

As toxinas detectadas nos casos associados à deficiência de fósforo foram as tipo C e D, já no surto associado a ingestão de alimento contaminado foi isolado somente a tipo D. Isso está de acordo com Lisboa et al. (1996), Dutra (2001), e Lemos (2005) onde nos surtos associados à osteofagia as toxinas C e D estiveram envolvidas, e nos surtos associados à alimentação a tipo D foi a predominante (DUTRA et al., 1993; DUTRA, 2001). A detecção de toxina tipo C e D é o esperado nessa região, pois essas são as toxinas predominantes no hemisfério sul (KRIEK & ODENDAAL, 1994; RADOSTITS et al., 2002).

O diagnóstico de botulismo, não pode ser consolidado, apenas na obtenção de culturas tóxicas do conteúdo gastrointestinal ou de fígados, pois os esporos podem estar presentes saprofitamente. Müller (1967) e Dutra et al. (1996) demonstraram que culturas de fígados de animais sadios, recém mortos podem conter *C. botulinum*, em cerca de 3 a 4% e 16 % dos casos, respectivamente. Esta possibilidade ressalta a importância do histórico clínico e a ausência dos achados anatomopatológicos para o diagnóstico do botulismo em bovinos (MÜLLER, 1967, LANGENEGGER & DÖBEREINER, 1988; SANTOS et al., 1993; LISBOA et al., 1996; DUTRA, 2001; LEMOS, 2005). Outro fator importante a ser considerado é a sensibilidade epidemiológica de 43,4% da soroneutralização em camundongo (DUTRA, 2001), evidenciando que o diagnóstico deve ser realizado com base nos sinais clínico-patológicos e epidemiológicos.

O botulismo associado à ingestão de alimentos contaminados ocorreu com menor frequência no Estado e para esse, o método mais eficaz de prevenção, é o fornecimento de alimento de boa qualidade aos animais.

O presente trabalho relata a importância sanitária do botulismo associado à deficiência de fósforo como causa de morte em bovinos, no estado de Santa Catarina, principalmente na região do Planalto Serrano. Os dados aqui apresentados reforçam a necessidade de divulgação da ocorrência da doença, além de adoção de medidas profiláticas específicas nos sistemas de criações extensivos, incluindo a correta suplementação mineral, a eliminação das carcaças nas pastagens e a vacinação.

## 7 CONCLUSÃO

O presente trabalho obtido por meio do estudo dos aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos e laboratoriais do botulismo em bovinos no estado de Santa Catarina, durante o período compreendido entre os anos de 1987 a 2008, permitiu concluir que:

- a) No estado de Santa Catarina ocorreu o botulismo na forma associada à deficiência de fósforo (relacionada com osteofagia) e na forma associada à ingestão de alimentos;
- b) A forma associada à deficiência de fósforo tem importância econômica na região do Planalto Serrano, onde ocorreu a maioria dos casos;
- c) Na forma de botulismo associada à deficiência de fósforo os fatores epidemiológicos relevantes são a deficiência de fósforo, a não suplementação mineral, a ausência de vacinação dos animais e presença de carcaças nas pastagens;
- d) Os surtos de botulismo endêmico ocorreram de dezembro a abril, acometendo, principalmente, vacas, em gestação ou em lactação;
- e) A forma de botulismo relacionada a alimentos contaminados foi associada à utilização de compostagem incompleta de carcaças de suínos e aves para adubação de pastagem;
- f) Tanto na forma de botulismo associado a deficiência de fósforo, quanto na forma associada a ingestão de alimentos contaminados os principais sinais clínicos relatados consistiam em incoordenação dos membros posteriores, diminuição do tônus da musculatura da língua, paralisia flácida progressiva, decúbito e morte. Na necropsia e exame histológico não foram observadas alterações significativas;
- g) Os tipos de toxinas C e D foram os responsáveis pelos surtos associados à osteofagia. O Tipo D foi responsável pelo surto associado à utilização de compostagem incompleta na adubação de pastagem.

- h) O diagnóstico de botulismo bovino, na maioria das vezes, pode ser realizado pela epidemiologia associada ao quadro clínico-lesional da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, A.; KEGELES, G.; HOTTLE, G. A. The purification toxin from *Clostridium botulinum* type A. **J. biol. Chem.**, v.164, p. 63-79, 1946.

ACHA, P. N. & SFRES, B. **Zoonosis y enfermedades comunes al hombre los animales**. 2.ed. Washington:OPS/OMS, 989p., 1986.

AKTORIES, K.; BÄRMANN, M.; OHISHI, I.; TSUYAMA, S.; JAKOBS, K. H.;  
HADERMANN, E. Botulinum C<sub>2</sub> toxin ADP-ribosylates action. **Nature**. v. 322, n. 6077, p. 390-392, 1986.

ALLISON, M. J.; MALOY, S. E.; MATSON, R. R. Inactivation of *Clostridium botulinum* toxin by ruminal microbes from cattle and sheep. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 32, n.5, p. 685-688, 1976.

BALDASSI, L. **Isolamento de bactérias do gênero *Clostridium* e detecção de toxina botulínica a partir de materiais obtidos de bovinos com suspeita clínica de botulismo**. 1986. 61f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1986.

BALDASSI, L.; HIPOLITO, M.; PORTUGAL M. A. S. C.; CALIL, E. M. B.; MOULIN A. P.; PIRES, D.C. botulismo bovino: comprovação laboratorial do diagnóstico clínico, período 1986-1989. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v.25, n.5, p. 371-374, 1991.

BARROS, C. S. L.; LEMOS, R. A. A.; CAVALLÉRO, J. C. M. **Manual de procedimentos para o diagnóstico histológico diferencial da Encefalopatia Espongiforme dos Bovinos (BSE)**. Editorial Lemos. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, 56p.1999.

BARSANT, J. A.; WALSER, M.; HATHEWAY, L.L.; BOWEN, J. M.; CROWELL, W. Type C botulism in American foxhund. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 172, p.809-813, 1978.

BEIRES, P. R. & SIMMONS, G. C. Botulism in pigs. **Australian Veterinary Journal**, v.43, p.270-271, 1967.

BENGSTON, I. A. Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilia Caesar*. **Public Health Rep.**, v. 37, p. 164, 1922.

BENNETS, H. W.; HALL, H. T. B. Botulism of sheep and cattle in Westrn Australia: Its cause and its prevention by immunization. **Aust. Vet. J.**, v. 14, p. 105-119, 1938.

BIENVENU, J. G & MORIN, M. Poultry litter associated botulism (type C) in cattle. **Can. Vet. J.** v. 31, p. 711, 1990.

BIER, O. Técnicas sorológicas gerais. In: **Bacteriologia e Imunologia**. 13ª. Ed., São Paulo, Ed. Melhoramentos,. p. 551-72, 1966.

BLOBEL, H. & SCHLIESSER, T. **Handbuch der bakteriellen infektionen bei Tieren**.Stuttgar: Gusfav Fischer. 749 p. 1990.

BÖHNEL, H.; SCHWAGERICK, B.; GESSLER, F. Visceral Botulism – A New Form of Bovine *Clostridium botulinum* Toxication. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, n. 6, p. p.373-383(11), August, 2001.

BÖHNEL, H.; NEUFELD, B.; GESSLER, F. Botulinum neurotoxin type B in milk from a cow affected by visceral botulism. **Vet J.** v.169, p.124-125, 2005.

BORGES, H. **Comunicação pessoal**. Responsável Técnico do Sindicato Rural de Lages. Avenida Luiz de Camões Parque de Exposições Conta Dinheiro, CEP: 88520-000, Lages, SC, 2009.

BREUKINK, H. J.; WAGENAAR, G.; WENSING, T.; NOTERMANS, S.; POULOS, P. W. Food poisoning in cattle caused by ingestion of brewrs grains contaminad with *Clostridium botulinum* type B. **Tijdschrift voor Diergeneeskunde**, v.103, n.6, p. 303-311, 1978.

BURKE, G.S. Notes on *Bacillus botulinus*. **J. Bacteriol.**, v. 4, p. 555-565, 1919.

CALVET, H.; PIGART, P.; DOUTRE, M. P.; CAMBRON, J. Aphosphorose et botulisme au Sénégal. **Rev. Élev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v. 18, p. 249-282, 1965.

CARDOSO, T., COSTA, M.; ALMEIDA, H. C.; GUIMARÃES, M.. Botulismo alimentar: estudo retrospectivo de cinco casos. **ACTA Médica Portuguesa**, Lisboa, v.17, p.54–58, 2004.

CARRUTHERS, A. Botulinum toxin type A: History and Current use in Upper Face. **Disease A Month**. v.48, n.5, May, 2002.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). **Biological reference reagents 1996 catalog**. Atlanta, 15p. 1996.

CERESER, N. D.; COSTA, F. M. R.; JÚNIOR, O. D. R.; SILVA, D. A. R. da; SPEROTTO, V. R. da. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.280-287, jan-fev, 2008.

CHAFFER, M.; BAUM, M.; GRINBERG, K.; MOLAD T.; ELAD. D. Application of PCR for Detection of *Clostridium botulinum* Type D in Bovine Samples. **J. Vet. Med. B.** v.53, p.45-47, 2006.

CLEGG, F. G.; JONES, T. O.; SMART, J. L.; MCMURTY, M. J. Bovine botulism associated with broiler litter waste. (Correspondence). **Veterinary Record**. v. 117, n. 1, p. 22, 1985.

COLBACHINI, L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MARQUES, J. L. Intoxicação Experimental de Bovinos com Toxina Botulinica tipo D. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v. 51, n. 3, p. 229-233, 1999.

COSTA, M. G.; SALVADOR S. C.; PEREIRA, M. N. Botulismo em bovinos leiteiros no sul De Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p.2068-2071, out., 2008.

CRAVEN, C. P. Controlo f a botulism-like disease in north Queensland. **Aust. Veter. J.**, v.40, p.127-130, 1964.

CURCI, V. C. L. M.; DUTRA, I. S.; DÖBEREIN, J.; JORGE LUCAS JUNIOR. Pré-compostagem de cadáveres de bovinos acometidos pelo botulismo. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v.27, n.4, p.157-161. Apr. 2007.

CURCI, V. C. L. M. **Resposta humoral de bovinos para os toxóides botulínicos C e D.** 2008. 36p. Tese (Doutorado Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, 2008.

DEZFULIAN, M. & BARTLETT, J. G. Detection of *Clostridium botulinum* type A toxin by enzyme-linked immunosorent assay with antibodies produced in immunologically tolerant animals. **J. Clin. Microbiol.**, v. 19, n. 5, p. 645-648, 1984.

DIVERS, T. J.; BAETHOLOMEW, R. C.; MESSICK, J. B.; WHITLOCK, R. H. *Clostridium botulinum* type B toxicosis in a herd of cattle and group of mules. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 4, p. 382-385, 1986.

DÖBEREINER, J.; LANGENEGGER, J.; TOKARNIA C. H. & DUTRA I. S. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.** v.99, n.5, p.188-190.1992.

DOWELL, V. R.; HAWKINS, T. M. **Laboratory methods in anaerobic bacteriology** – CDC Laboratory Manual. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, Atlanda, Geodgia, 1974. 96p.



DRESSLER, D.; SABERI, F. A.; BARBOSA, E. R. Toxina botulínica: mecanismos de ação. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** São Paulo, v.63, n.1, Mar. 2005.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I. V.; BOND, V. Botulismo de origem hídrica em bovinos no Brasil. **WORLD BUIATRICS CONGRESS**, 16., 1990, Salvador, BA. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p. 547-550. 1990.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J. O Botulismo dos Bovinos e o seu controle. Comunicado Técnico 72. EMBRAPA. Seropédica/RJ. Dezembro 2004. Disponível em: <  
<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/cot072.pdf> > Acesso em 10 jan. 2009.

DUTRA, I. S.; WEISS, H. E.; DÖBEREINER, J. Epizootiology of botulism on cattle in Brazil. In: **CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**, 13., 1992, Santiago, Chile. **Anais...** Santiago: Sociedade Panamericana de Ciências Veterinárias, p.343, 1992.

DUTRA, I. S.; WEISS, H. E.; WEISS, H.; DÖBEREINER, J. Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfização de complemento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.13, n. 3/4, p. 83-86, 1993.

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. & DÖBEREINER, J. Eficácia da Vaxall vacina botulínica bivalente – na prevenção do botulismo em bovinos. **Hora Veterinária**, v.16, n. 93. p. 22-26, 1996.

DUTRA, I. S. **Comunicação pessoal**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias: Campus de Araçatuba. 1997.

DUTRA, I. S. Diagnóstico diferencial do botulismo. 28/02/2003. Disponível em: <  
<http://www.beefpoint.com.br/default.asp.noticiaID> > Acesso em: 15 abril 2009.

DUTRA, I. S. **Epidemiologia, sinais clínicos e diagnóstico pela soroneutralização em camundongo do botulismo em bovinos no Brasil**. 2001. 152 p. Tese (Livre docência) -

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2001.

DUTRA, I. S.; SOUZA, A. M.; DÖBEREINER, J. Botulismo em bovinos associado à silagem contaminada. *In: IV Congresso Brasileiro de Buiatria, 2001*, Campo Grande. Anais do IV Congresso Brasileiro de Buiatria. Campo Grande: ABB, v. 1. p. 44, 2001.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I. V.; SOUZA, L. A. A.; NONATO, N. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associado à ingestão de água contaminada. **Pesq. Vet. Bras.** v.21, n.2, p.43-48, abr./jun. 2001.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J. & SOUZA, A. M. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesq. Vet. Bras.** v.25, n.2, p.43-48, abr./jun. 2005.

EMBRAPA, 2001. **Mapa dos solos de Santa Catarina segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (1999)**. Governo do Estado de Santa Catarina. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Rural e da Agricultura. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. Centro Integrado de Informações de Recursos Ambientais – Ciram, 2001.

FERREIRA, R. M. M. **Contaminação ambiental pelo *Clostridium botulinum* tipos C e D de valas de captação hídrica e cultivo do microorganismo em um sistema experimental**. Campinas, SP. 2002. 58p. Tese (Mestrado) - Instituto de Biologia, Unicamp, 2002.

FJOLSTAD, M. The effects of *Clostridium botulinum* type C<sub>1</sub> given orally to goats. **Acta Vet. Scand.**, v.14, n.1, p.69-80, 1973.

FONSECA, F. S. **Comparação da resposta humoral de bovinos e cobaias vacinados com toxóides botulínicos bivalentes C e D**. 2001. 55 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

FRANCIOSA G; POURSHABAN M; GIANFRANCESCHI M; GATTUSO A; FENICIA L; FERRINI AM; MANNONI V; DE LUCA G; AURELI P. *Clostridium botulinum* spores and

toxin in mascarpone cheese and other milk products. **Journal of Food Protection**, Ames, v.62, n.8, p.867–871, 1999.

GALEY, F. D.; TERRA, R.; WALKER, R.; ADASKA, J.; ETCHEBARNE, M. A.; PUSCHNER, B.; FISHER, E.; WHITLOCK, R. H.; ROCKE, T.; WILLOUGHBY, D.; TOR, E. Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 3, p. 204-209, 2000.

GAVA, A. **Comunicação pessoal**. Lages: Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC. Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV. Campus de Lages, 1987.

GELLI, D.S.; JAKABI, M.; SOUZA, A. Botulism: a laboratory investigation on biological and food samples from cases and outbreaks in Brazil (1982-2001). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.44, n.6, p.321-324, 2002.

GESSLER, F.; HAMPE, K.; BÖHNEL, H. Sensitive detection of botulinum neurotoxin types C and D with an Immunoaffinity Chromatographic Column Test. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 12, p. 7897-7903, Dec. 2005.

GIBSON, L. A. S. Botulism in dairy cows. **Vet. Rec.**, v. 118, n. 11, p. 309, 1986.

GIMÉNEZ, D.F.; CICCARELLI, A.S. Another type of *Clostridium botulinum*. **Zentralbl. Bakteriol.**,[Orig.], v. 215, n. 5, p. 221-224. 1970.

GIMÉNEZ, D.F.; CICCARELLI, A.S. *Clostridium botulinum* en Argentina: presenty futuro. **Revista Asociacion Argentina Microbiologia**, v. 8, n. 2. p.82-91, 1976.

GONZÁLEZ, F. H. D., OSPINA, H. P.; BARCELLOS, J. O. (Eds). **Nutrição mineral em ruminantes**. 2.ed. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, p.111-131, 1998.

HAAGSMA, J & TER LAAK , E. A. Een geval van botulismus type B Big runderen, veroorzaakt door de veoedering van kuilgras. **Tijdschrift Veoor Diergeneeskunde**, v.103, p.910-912, 1978.

HAAGSMA, J.; HAESEBROUCK, F., DEVIRIESE, L.; BERTELS, G. Na outbreak of botulism type B in horses. **The Veterinary Record**, 127, p.206. 1990.

HATHEWAY, C.L. Botulism: The present status of the disease. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.195, p.55-75, 1995.

HATHEWAY, C. L.; FRREIRA, J. L. Detection and identification of *Clostridium botulinum* neurotoxins. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.391, p. 481-498, 1996.

HAUSCHILD, A. H. W. *Clostridium botulinum* toxins. **Int. J. Food Microbiol.**, v.10, n.2, p.113-124, 1990.

HAZEN, E.L. ASTRAIN O. F *Bacillus botulinus* not classified as A, B or C. **J. Infect. Dis.**, v.60, p.260-264. 1937.

HEIDER, L. C., MCCLURE, J. T., LEGER, E. R. Presumptive diagnosis of *Clostridium botulinum* type D intoxication in a herd of feedlot cattle. **Can. Vet. J.** 42, p. 210-212, 2001.

HENNING, M. W. **Animal Diseases in South Africa**. 3<sup>rd</sup> ed. Pretoria: Central News Agency, 351p., 1956.

HOBBS, G.; CROWTHER, J.S; NEAVES, P.; GIBBS, P. A; JARVIS, B. Detection and isolation of *Clostridium botulinum*. In: CORRY, J. E. L.; ROBERTS, D.; SKINNER, F. A.(eds). **Isolation and identification Methods for Food Poisoning Organisms**. London, New York: Academic Press, Inc.1982.

HOGG, R. A., WHITE, V. J. & SMITH, G. R. Suspected botulism in cattle associated with poultry litter. **Vet. Rec.** v.126, n.19, p.476-479.1990.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Efetivo dos rebanhos - cabeça, Unidade de Federação: Santa Catarina (2002 a 2007). **Censo Agropecuário**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/estadosat/produçãopecuaria2007/noticias> > Acesso em: 16 ago. 2009.

JANSEN, B. C.; KNOETZE, P. C.; VISSER, F. The antibody response of cattle to *Clostridium botulinum* types C and D toxoids. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 43, n. 4, p. 165-174, 1976.

JANSEN, B. C. & KNOETZE, P. C. The taxonomic position of *Clostridium botulinum* type C. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v.44, n.2, p. 53-54, 1977.

KEET, C.A. & STROBER, J. B. Recent advances in infant botulism. **Pediatric Neuroscience**, Basel, v.32, p.149-154, 2005.

KLEWITZ, T.; GESSLER, F.; BEER, H.; PFLANZ, K.; SCHEPER, T. Immunochromatographic assay for determination of botulism neurotoxin type D. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v.113, p.582-589, 2006.

KRIEK, N. P. J.; ODENDAAL, M. W. Botulism. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (ed.) **Infections diseases of livestock**. Cape Town: Oxford Press, p.1354-1371, 1994.

LANGENEGGER, J. Epidemiologia do botulismo no nosso meio, aspectos relacionados ao diagnóstico da doença e considerações sobre a utilização da vacina. In: **SIMPÓSIO SOBRE CARÊNCIAS MINERAIS NO ESTADO DE GOIÁS, GOIÂNIA, GO. Anais...**Goiânia: Sociedade Goiana de Medicina Veterinária. p. 218-237. 1981.

LANGENEGGER, J.; DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H. Botulismo epizootico em bovinos no Brasil. **Agroquímica**, n. 20, p. 22-26, 1983.

LANGENEGGER, J.; SCARSI, R. M.; MARTINS, S. C. “Mal de Alegrete”: epidemiologia, clínica e patologia. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 19, 1984, Belém, PA. **Anais...**Belém: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p. 138. 1984.

LANGENEGGER, J.; DÖBEREINER, J. Botulismo enzoótico em búfalos no Maranhão. **Pesq. Vet. Bras.** v.8, n.1/2, p.37-42, jan./jun. 1988.

LEMOS, R. A. A.; BRUM, K. B.; MORI, A. E.; BONILHA, M. M.; KATAYAMA, K. A.; ANGREVES, G. M.; CAVALLÉRO, J. C. M. Doenças caracterizadas por sintomatologia nervosa em bovinos em Mato Grosso do Sul. In: BARROS, C. S. L.; LEMOS, R. A. A.; CAVALLÉRO, J. C. M. (Ed.). **Manual de procedimentos para diagnóstico histológico diferencial da encefalopatia espongiforme dos bovinos (BSE)**. São Paulo: Lemos. p. 31-48. 2001

LEMOS, R. A. A. **Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil**. 2005. 150f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. 2005.

LIMA, C. G. R. D.; NETA, A. V. C. Botulismo: uma doença que pode ser evitada. 24/10/2007. Disponível em: < <http://www.beefpoint.com.br/default.asp?noticiaID> > Acesso em: 20 maio 2009.

LISBOA, J.A.N.; KUCHEMBUCK, M.R.G.; DUTRA I.S.; GONÇALVES, R. C.; ALMEIDA, C.I.; BARROS FILHO, I. R. Epidemiologia e quadro clínico do botulismo epizootico dos bovinos no Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 16, n.2/3, p.67-74, 1996.

LOBATO, F. C. F.; ALMEIDA, A.C; ABREU, V. L.V; NASCIMENTO, R. A. Surto de botulismo em bovinos alimentados com cama de frango no Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.47, n.6, p.849-850, dez., 1995.

LOBATO, F. C. F. **Isolamento e caracterização de amostras de *Clostridium botulinum* – tipos C e D no Brasil**. Belo Horizonte, 1997. 121 p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.

LOBATO, F. C. F.; ALMEIDA, A.C.; ABREU, V. L. V.; SILVA, N.; NASCIMENTO, R. A.; MARTINS, N. E. Anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados com toxóides botulínicos monovalentes e bivalentes tipos C e D. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 25-27, 1999.

LOBATO, F. C. F.; SALVARANI, F. M.; SILVA, R. O. S.; SOUZA, A. M. de; LIMA, C. G. R. D.; PIRES, P. S.; ASSIS, R. A. de; AZEVEDO, E. O. de. Botulismo em ruminantes causado pela ingestão de cama-de-frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p.1176-1178, jul, 2008.

MACKAY, R. J. & BERKHOFF, G. A., Type C toxicoinfectious botulism in a foal. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.180, p.163-164, 1982.

MASSON, J. H.; STEYN, H. P.; BISSCHOP, J. H. R. The immunization of bovines against lamsiekte. **J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.**, v. 180, p. 163-164, 1938.

McDOWELL, L. R. **Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizando o Brasil**. 3. ed. Gainesville: Universidade da Florida, 92 p., 1999.

MCLLROY, S. G.; MCCracken, R. M; HUEY J. A. Botulism in cattle grazing pasture dressed with poultry litter. **Irish Veterinary Journal**.v 41, p.245-248, 1987.

McLOUGHLIN, M. F.; MCILROY, S. G. & NEIL S. D. A major outbreak of botulism in cattle being fed ensiled poultry litter. **Vet. Rec.** v.122, n.24, p.579-581.1988.

MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; FERREIRA, J. L. M. **Doenças diagnosticadas no ano de 1986. Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico**. Pelotas: Ed. da UFPel, p.40, 1987.

MENEGUCCI, E. A.; DUTRA, I. S.; DOBEREINER, J. Sensibilidade toxicológica e especificidade do teste de microfixação de complemento na detecção de toxinas botulínicas C e D em meio de cultura e fígado de camundongo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 47-52, 1998.

MEYER, K.F. & DUBOVSKY, B. J. The distribution of the spores of *B. botulinus* in California. **Journal of Infectious Disease**, v.31, p. 541-555, 1922a.

MEYER, K.F. & DUBOVSKY, B. J. The distribution of the spores of *B. botulinus* in the United States. **Journal of Infectious Disease**, v.31, p. 559-594, 1922b.

MEYER, K.F. & DUBOVSKY, B. J. The occurrence of the spores of *B. botulinus* in Belgium, Denmark, England, The Netherlands and Switzerland. **Journal of Infectious Disease**, v.31, p. 600-609, 1922c.

MEYER, K.F. Maximum oxygen tolerance of *Clostridium botulinum* A, B and C of *Clostridium sporogenes* and *Clostridium welchii*. **J. Infect. Dis.**, v. 44, p. 408-411, 1929.

MOLLER, V. & SCHEIBEL, I. Preliminary report on the isolation of an apparent new type of *Clostridium botulinum*. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v.48, p. 80, 1960.

MOORE, P. & NAUMANN, M. **Handbook of Botulinum Toxin Treatment**. Second ed. Massachussetts. BlackWel Science, 2003.

MOREIRA, E. C.; LIMA, J. D.; LEITE, R. Botulismo no sul de Goiás e Marajó. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 17. Fortaleza, 1980. **Anais**. Fortaleza, 1980. p.24. (Resumo)

MORIISHI, K.; SYUTO, B.; KUBO, S. OGUMA, K.; Molecular diversity of neurotoxins from *Clostridium botulinum* type D strains. **Infect. Immun.**, v.57, n.9, p. 2886-2891, 1989.

MÜLLER, J. On the occurrence of *Clostridium botulinum* type C beta in the livers of slaughter animals in Denmark. **Bull. Off int. Epizoot.** v.67, p.1473-1478, 1967.

MYLLYKOSKI, J.; LINDSTRÖM, M.; KETO-TIMONEN, R.; SÖDERHOLM, H.; JAKALA, J.; KALLIO, H.; SUKURA, A.; KORKEALA, H. Type C bovine botulism outbreak due to carcass contaminated non-acidified silage. **Epidemiol. Infect.** v.137, p.284–293, 2009.

NEIL S. D; MCLOUGHLIN, M. F.; MCILROY, S.G. Type C botulism in cattle being fed ensiled poultry. **Vet. Rec.** v124, p.558-560, 1989.

OCHANDA, O. J.; SYUTO, B.; OGUMA, K.; IIDA, H.; KUBO, S. Comparison of antigenicity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.47, n.6, p. 1319-1322, 1984.



OGUMA, K.; SYUTO, B.; IIDA, H.; KUBO, S. Antigenic similarity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. **Infect. Immun.**, v.30, n.3, p. 656-660, 1980.

OGUMA, K.; SYUTO, B.; AGUI, T.; IIDA, H.; KUBO, S. Homogeneity and heterogeneity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. **Infect. Immun.**, v.34, n.2, p. 382-388, 1981.

OGUMA, K.; MURAYAMA, S.; SYUTO, B.; IIDA, H.; KUBO, S. Analysis of antigenic of *Clostridium botulinum* type C1 and D toxins by polyclonal and monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, v.43, n.2, p. 584-588, 1984.

OHISHI, I.; IWASAKI, M.; SAKAGUCHI, G. Purification and characterization of two components of botulinum C<sub>2</sub> toxin. **Infect. Immun.**, v.30, n. 3., p. 668-673, 1980.

OHISHI, I. & ODAGIRI, Y. Histopathological effect of botulinum C<sub>2</sub> on mouse intestines. **Infect. Immun.**, v.43, n.1, p. 54-58, 1984.

OHISHI, I. & DASGUPTA, B. R. Molecular structure and biological activities of *Clostridium botulinum* C<sub>2</sub> toxins. In: EKLUND, M. W & DOWEL, V.R. **Avian botulism: an international perspective**. Springfield: Charles C. Thomas, 1987.

ORTOLANI, E. L. Panorama epidemiológico da mortalidade enzoótica de bovinos adultos no Brasil e no Paraguai: Retrospectiva e levantamentos. **Hora Veterinária**, v.12, p. 20-25, 1993.

ORTOLANI, E. L.; SCHALCH, U. M.; BALDASSI, L.; BRITO, L. A. B.; PACHECO, J. C. G.; MORI, C. S. Ocorrência de um surto de botulismo em bovinos que ingeriram “cama frango”, no município de Pirassununga, estado de São Paulo – SP. **XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA-1996**.

POULAIN, B. & HUMEAU, Y. Le mode d’action des neurotoxines botuliques: aspects pathologiques, cellularis et moléculaires. **Annales de réadaptation et de médecine physique**. v.46, p.265-275, 2003.

PROPHET, E. B., et al. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: American registry of pathology, 274p, 1992.

PURVES, D; AUGUSTINE, G. J; FITZPATRICK, D. **Neuroscience**. 3 ed. Massachusetts, Sinauer, p.110-116, 2004.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737 p., 2002.

RIBAS, A.I.; FERREIRA, R.M.M.; MASSER, R.C.; CIANI, R.B.; DUTRA, I.S. Detecção de esporos de *Clostridium botulinum* em costelas de cadáveres decompostos de bovinos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 23, 1994. Olinda. **Anais...** Olinda: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária. p.142, 1994.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; OLIVEIRA, J. A.; GILTURNES, C.; GONÇALVES, A. **Atividades do Laboratório Regional de Diagnóstico e doenças da área de influência no período 1978-1982**. Pelotas: Editora Universitária, 97 p. 1983.

ROBINSON, E.M. The bacteria of the *Clostridium botulinum* C and D types. Sixteenth **Report of the Director of Veterinary Services**. Union of South Africa. 1930.

ROSA, I. V. **“Doença da Vaca Caída” – A Bênção Disfarçada**. Comunicado Técnico da Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC). Campo Grande, MS, BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970.1991.

SAKAGUCHI, G. *Clostridium botulinum* toxins. **Pharm. Ther.**, v.19, p. 165-194, 1983.

SANTOS, L. B.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A.; SOUZA, M. A.; COELHO, H. E.; TAKETOMI, E. A.; CARDOSO, A. A. L. M.; METIDIERI, M. A. Botulismo experimental em caprinos pela toxina tipo C1. **Pesq. Vet. Bras.**, v.13, p. 73-76, 1993.

SCHIMIDT, H. A. Loin disease of cattle in the coastal plains of Texas. **Texas Agr.Exp. Snt Annual Report**. 1916.

SEDDON, H.R. Bulbar paralysis in cattle due to a toxigenic *Bacillus*. **J. Comp. Pathol. Ther.**, v. 35, p. 147-190, 1922.

SEDDON, H. R. The cause of botulism in animals in Australia. **J.Aust. Veterinary Assoc.**, v.1, p.3-59, 1925.

SEIFERT, H. & BÖEHNEL, H. 1994. Clostridioses. *In*: BLOBEL, H.; SCHLIESSER, T. **Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren**. Band II. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, p. 89-153, 1994.

SETLER, P. E - Therapeutic use of botulinum toxins: background and history. **Clin J Pain**. 18 (6suppl) p.119-124, 2002.

SHONE, C.; WILTON-SMITH, P.; APPLETON, N.; HAMBLETON, P.; MODI, N.; GATLEY, S.; MELLING, G. Monoclonal antibody-based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is comparable to the mouse bioassay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.50, n.1, p.63-67, 1986.

SILVA, D. A. O.; SOUZA, M. A.; BEICHER, A. M. A. H.; MINEO, J. R.; FERREIRA, F. A.; COELHO, H. E.; BASTOS, J. E. D. Ensaio imunoenzimático (Elisa) para detecção de toxina botulínica tipo D. **Pesq. Vet. Bras.**, v.12, p. 13-16, 1991.

SIMMONS, G. C. & TAMMEMAGI, L. *Clostridium botulinum* type D as cause of bovine botulism in Queensland. **Aust. Vet. J.**, v.40, p.123-127, 1964.

SIMPSON, L. L. A comparison of the pharmacological properties of *Clostridium botulinum* type C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> toxins. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.223, n.3, p. 695-701, 1982.

SKULBERG, A. & HAUSKEN, W. The differentiation of various of *Clostridium botulinum* and transformation experiments with type E. **J. Appl. Bact.**, v. 28, p. 83-89, 1965.

SMITH, L.D.S & HOLDEMAN, L.V. **The Pathogenic Anaerobic Bacteria**. Springfield, Charles C. Thomas, 423p. 1968.

SMITH, L. D. S & HOBBS, G. Genus III. *Clostridium prazmowski* 1880. *In*: BUCHANAN, R. E. & GIBBONS, N. E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8.ed. Baltimore, Willians & Wilkins, p. 551-572, 1974.

SMITH, L.D.S. **Botulism**: the organism, its toxins, the disease. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas, 1977.

SMITH, G. R; OLIPHANT, J. C.; EVANS, E. D. Diagnosis of botulism in water birds. **The Veterinary Record**, v. 112, p.456-458, 1983.

SMITH, L. D. S & SUGIYAMA, H. **Botulism: the organism, its toxins, the disease**. 2.ed. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas, 1988.

SOUZA, A. M. **Distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* no solo em torno de cadáveres decompostos de bovinos vítimas de botulismo em pastagens no sul de Goiás**. 1985. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1985.

SOUZA, A. M.; MARQUES, D. F.; DUTRA, I. S. Botulismo enzoótico bovino de origem hídrica em Goiás. **XXIV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 1996, Goiânia, 1996.

SOUZA, A. M.; MARQUES, D. F.; DUTRA, I. S. Mal das Cacimbas. *In*: **CONBRAVET. II Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul. XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária. XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado, Rio Grande do Sul. p.165, 1997.

SOUZA, A. M. **Ocorrência de esporos e toxinas de *Clostridium botulinum* tipos C e D em cacimbas utilizadas como bebedouros de bovinos em pastagens do Vale do Araguaia, Estado de Goiás, Brasil**. 2001. 164 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SOUZA, A. M.; MARQUES D. F.; DÖBEREINER, J.; DUTRA I.S. Esporos e toxinas de *Clostridium botulinum* dos tipos C e D em cacimbas no Vale do Araguaia, Goiás. **Pesq. Vet. Bras.** v. 26, n. 3, jul./set. 2006.

STEINMAN, A.; CHAFFER, M.; ELAD, D.; SHPIGEL, N. Quantitative analysis of levels of serum immunoglobulin G against Botulinum neurotoxin type D and association with protection in natural outbreaks of cattle botulism. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, n. 8, p.862-868, 2006.

STEPHEN, J.; PIETROWSKI, R. A. **Bacterial toxins**. 2ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986.

STÖBER, M. Differential symptomatologie einiger Krankheiten des zentralen Nervensystems des Rindes. **Vet. Med. Nachr.**, v.2, n.1, p. 99-121, 1984.

STÖBER, M. Botulismus. In **Innere Medizin und Chirurgie des Rindes**. 4<sup>th</sup> ed. DIRKSEN, G.; GRÜNDER H-D.; STÖBER, M. Berlin, Parey Buchverlag. p.1113-1119, 2002.

SUEN, J. C.; HATHEWAY, C.L; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. *Clostridium argentinense* sp. Nov.: a genetically homogeneous group composed of all strains previously identified as *C. subterminale* or *C. hastiforme*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.38, p. 375-381, 1988.

SUGIYAMA, H. Clostridium botulinum neurotoxin. **Microbiol. Rev.**, v.44, p.419-448. 1980.

SWERCZEK, T. M. Experimentally induced toxico-infectious botulism in horses and foals. **Journal of the American Veterinary Research**, v.41, p.348-350, 1980a.

SWERCZEK, T. M. Toxico-infectious botulism in foals and adult horses. **Journal of the American Veterinary Research**, v.176, p.217-220, 1980b.

TAKAHASHI, M.; KAMEYMA, S.; SAKAGUCHI, G. Assay in mice for low levels of *Clostridium botulinum* toxin. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 11, p. 271-278, 1990.

TAMMEMAGI, L.; GRANT, K. M. Vaccination en the control of bovine botulism in Queensland. **Aust. Vet. J.**, v. 43, p. 368-373, 1967.

TERAJIMA, J.; SYUTO, B.; OCHANDA, J.O; KUBO, S. Purification and characterization of neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* type C. **Infec. Immun.**, v.48, p. 312-317, 1985.

THEILER, A. The cause and prevention of lamsiekte. **J. Dep. Agric.**, v. 1, p. 221-224, 1920.

THEILER, A.; ROBINSON, E.M. Der Botulismus der Haustiere. **Zsch. Infektionskr.**, v. 31, p. 165-220, 1927.

THIONGANE, Y.; LEFORBAN, Y.; DOUTRE, M. P. Le botulisme de type D au Sénégal. Un nouveau foyer d'origine hydrique responsable d'une forte mortalité. **Revue D'Éléments ET de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, v. 37, n. 2, p. 152-154, 1984.

THOMAS, R. J. Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. **Aust. Vet. J.**, v.68, n.3, p.111-3. Mar., 1991.

TOKARNIA, C. H.; LANGENEGGER, J; LANGENEGGER, C. H.; CARVALHO, E. V. Botulismo em bovinos no Estado do Piauí, Brasil. **Pesq. Agropec. Bras., ser. vet.**, v.5, p.465-472, 1970a.

TOKARNIA, C. H.; CANELLA, C. F. C.; GUIMARÃES, J. A.; DÖBEREINER J.; LANGENEGGER, J.; Deficiência de fósforo em bovinos no Piauí. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.5, p.483-494, 1970b.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J; MORAES, S.S. Situação atual e perspectivas da investigação sobre nutrição mineral em bovinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.8, n.1/2, p. 1-16, 1988.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J; PEIXOTO, P. V. Deficiências Minerais em Animais de Fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. **Pesquisa Veterinária Brasileira, Seropédica**, v. 20, n. 3, p. 127-138, 2000.

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. **Vet. Rec.**, v. 130, p. 390-400, 1992.

TURNES, C. G.; LANGENEGGER, J.; SCARSI, R. M. “Mal de Alegrete”: evidências de *Clostridium botulinum* D como agente etiológico. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1984**. Belém, PA. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p.138, 1984.

UNDERWOOD, E. J. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 2nd ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, England, p.102-103, 1981.

VAN ERMENGEM, E. Über einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. **Zschr. Hyg. Infektionskrankh.**, v.26, p. 1-56, 1897.

VARGAS, A. C.; WEISS, L. N.; LAZZARI, A.; KLAUSS, M.; PEDROZO, A. F.; CASTAGNA, L.; COSTA, M. M.; DUTRA, I. S. Botulismo em bovinos confinados no RS: Relato de caso. 1997. **CONBRAVET. II Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul. XIII Congresso Estadual de Medicina Veterinária. XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado, Rio Grande do Sul. p.163, 1997.

VERONEZI, L. O.; BORELLI V.; ANTONIASSI N. A. B.; TRAVERSO S. D.; DUTRA I. S.; GAVA, A. Aspectos clínicos e epidemiológicos de botulismo em bovinos no Estado de Santa Catarina. **XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária - ENAPAVE**. Campo Grande. p. 148-149. 2007.

VERONEZI, L. O.; TRAVERSO, S. D.; DUTRA, I. S.; NUNES, V.; SILVA, T. C. E.; GAVA, A. Botulismo em bovinos associado ao consumo de pastagem de aveia contaminada com compostagem incompleta de suínos e aves. **XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária - ENAPAVE**. São Paulo, 2009.

WALLACE, V. & McDOWELL, D. M. Botulism in dog-first confirmation case in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.34, p.149-150, 1986.

WEISS, H. E.; WEISS, H. Nachweis von *Clostridium botulinum* – Toxin mittels Mikro-Warmekomplementbindungsreaktion. **Tierarztl. Umschau**, v. 43, p. 117-126, 1988.

WEISS, H. E.; RADEMACHER G.; DOLL, K.; DIRKSEN, G. Schnelldiagnose des Botulismus beim Rind mittels Mikro-Warmekomplementbindungsreaktion. **Dtsch. Tierarztl. Wschr.** v.97, p.398-400. 1990.

WENZEL, R. G. Pharmacology of botulinum neurotoxin serotype A. **Am J Health-Syst Pharm**, v. 61(suppl 6), p.5-10, 2004.

WILSON, R. B.; BOLEY, M. T.; CORWIN, B. Presumptive botulism in cattle associated with plastic-packaged hay. **J. Vet. Diagn. Inves.** v.7, p.167-169, 1995.

WOBESER, G.; BAPTISTE, K.; CLARK, E. G. Type C botulism in cattle in association with a botulism die-off in waterfowl in Saskatchewan. **Can. Vet. J.** v.38, p.782, December, 1997.

ZURBRIGGEN, M. A.; SONI, C. A.; PASINI, M. I.; DRAGH DE BENITEZ M. G.; HOMSE, C. A.; BAEZ KOHN, R. A.; ROCHINOTI, D.; CARDONA LÓPES, G. A.; SOMMA DE FERRE, G. R.; LAPHITZ, L.; VANZINI, V. R. Botulismo bovino en la Provincia de Corrientes (Argentina). **Vet. Argentina**, v.28, p. 751-755, 1986.