

## INTOXICAÇÃO NATURAL POR *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* TIPO “C” EM GRUPO DE AVES DOMÉSTICAS.

(*Natural Clostridium botulinum type “C” toxicosis in a group of chicken.*)

PIGATTO, C.P.<sup>1</sup>; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.<sup>2</sup>; CHIODA, T.P.<sup>1</sup>; GARCIA, G.R.<sup>1</sup>; VITTORI, J.<sup>1</sup>; BERCHIELLI, S.C.P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pós-Graduando(a), Universidade Estadual Paulista, carolinepigatto@yahoo.com.br / (16)3203-9082;

<sup>2</sup>Professor Titular, Universidade Estadual Paulista;

<sup>3</sup>Técnica, Universidade Estadual Paulista.

**RESUMO** - O *Clostridium botulinum*, causador de toxinfecção devido à ingestão de toxina previamente formada, acomete várias espécies com destaque para as aves. Em uma granja do estado de São Paulo, mais de 3000 aves foram acometidas por esta toxinfecção, a qual foi caracterizada por animais imóveis, dispnéicos, anoréxicos, paralisia flácida e morte subsequente. Foi realizada a colheita de sangue para obtenção do soro e posterior necropsia sendo que as amostras separadas para análise foram: fígado, conteúdo da moela e do inglúvio, ração, água e cama. Foram realizadas extração de toxina em gelatina tamponada e inoculação em camundongos, isolamento do agente em meio Agar Sangue, “Reinforced Clostridium Ágar” e neutralização da toxina para especificação de seu tipo. A inoculação em camundongos apresentou positividade para amostras do fígado, conteúdo da moela e do inglúvio, pela observação de cintura de vespa e morte dos animais por paralisia flácida. Colônias isoladas suspeitas de *Clostridium botulinum* apresentaram bioquímica compatível com a da espécie e a análise com a antitoxina revelou positividade para toxina botulínica tipo C. A conscientização do produtor para um bom manejo e eliminação adequada de carcaças são práticas fundamentais para evitar casos como este.

**Palavras-chave:** botulismo; bacteriologia; aves

**ABSTRACT** - *Clostridium botulinum* causative of toxic infections due to toxin ingestion previously formed, occur in several ingestion species, mainly birds. In a poultry farm, located at São Paulo State, more than 3,000 birds have been attacked by this toxic infections, when the birds showed motionless, loss of weight, accelerated, breathing, resulting in death of the birds. The blood harvest for attainment of the serum and later necropsy was carried out through the following samples: liver, gizzard, crop, feed, water and litter. After that, the toxin was extracted by gelatin-phosphate buffer and inoculation in mice, isolation of the agent in Blood Ágar and Reinforced *Clostridium* Ágar and neutralization of toxin determine its type. The inoculation in mice showed positive results in samples of liver, gizzard, crop and symptoms like was waist, and death of the birds by limp paralysis. The colonies that have been isolated, suspected of *Clostridium botulinum* showed expected results and further analysis revealed positive results to botulinical toxin type C. The farms have to pay attention in the routine jobs, choicer, and elimination of carcass because they are essential to keep this problem away.

**Keywords:** botulism; bacteriology; animals

## INTRODUÇÃO

O botulismo nos animais é uma intoxicação ocasionada pela ingestão da toxina previamente formada pelo *Clostridium botulinum*. Esta enfermidade pode acometer várias espécies animais, incluindo as aves domésticas e silvestres (SCHOCKEN-ITURRINO, 2007). O quadro clínico é caracterizado por intoxicação aguda desencadeada pela neurotoxina produzida pelo agente, sendo os principais sinais encontrados nas aves: debilidade, prostração, paralisia flácida e falência cardio-respiratória levando, os animais a óbito. A grande maioria dos casos de botulismo em aves é provocada pelo *Clostridium botulinum* tipo C, entretanto surtos envolvendo os tipos A e E também foram relatados (SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 1990a).

Em uma granja avícola situada no estado de São Paulo, região Sudeste do Brasil foi verificada a morte de mais de 3000 aves. Estes animais apresentaram paralisia flácida das pernas, asas, pescoço e da terceira pálpebra. Permaneciam imóveis e deitados, dispnéicos e anoréxicos. As asas caíam e o pescoço encontrava-se distendido para frente e apoiado no chão (quadro denominado *limberneck*). Devido a paralisia das pálpebras, as aves apresentavam-se com aspecto de mortas. Ao serem levantadas tinham dificuldade para respirar. A morte ocorria pela falência cardiorrespiratória. As aves afetadas apresentavam penas arrepiadas, que se destacavam com facilidade. A morte dos animais ocorreu em período médio de dois dias após a apresentação dos principais sinais. Frente ao apresentado anteriormente, o objetivo deste trabalho foi investigar a alta mortalidade das aves e confirmar a suspeita de botulismo através de testes laboratoriais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Dez animais apresentando o quadro clínico foram encaminhados ao Laboratório de Anaeróbios da Faculdade Estadual Paulista de Jaboticabal/SP para avaliação. Foi realizada a colheita de sangue para obtenção do soro e posterior necropsia, as amostras separadas para análise foram: fígado, conteúdo da moela e do ingluvío, além da ração, água e cama dos frangos. Parte do fígado macerado, o conteúdo da moela e do ingluvío, ração, água e cama foram submetidos à extração de toxinas individualmente em 200mL de solução de gelatina tamponada, pH 6,2 (previamente esterilizada), incubada a 4°C durante 24 horas. Após este período o material foi clarificado em centrífuga refrigerada a 12000 rpm, a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi filtrado

em membrana de ésteres de celulose de 0,45µ e 0,5 mL do extrato obtido foi inoculado em camundongos (*Mus musculus*) intraperitonealmente. O soro sanguíneo foi inoculado em camundongos logo após sua obtenção. Estes animais foram observados durante dez dias para a verificação da presença de sinais característicos de botulismo (fotofobia, incordenação, paralisia flácida de membros posteriores, fraqueza e dificuldade respiratória caracterizada pela contração da musculatura abdominal e intercostal, gerando um quadro conhecido como "cintura de vespa") ou morte pela ação da toxina (SMITH, 1977).

Para o isolamento do agente outra fração do material foi inoculada em tubos contendo meio para o crescimento de *Clostridium*: "Brain Heart Infusion" (BHI) acrescido de 0,05% de cloridreto de cisteína, submetido a choque térmico (80°C durante 15 minutos e imediatamente após, resfriado a 30°C em água com gelo) e incubado a 35°C por 24 a 48 horas (ANDO, 1953). Após crescimento foram realizados esfregaços corados pelo Gram para confirmar a presença de bastonetes Gram positivos esporulados. As amostras positivas foram semeadas em placas de "Reinforced Clostridium Ágar" e Ágar Sangue 5%, incubadas em jarra de anaerobiose por 24 a 48 horas a 35°C. As colônias típicas de *Clostridium* foram submetidas à identificação bioquímica (BLAIR *et al.*, 1971).

Após o isolamento das colônias que causaram a morte dos camundongos, foi realizada a neutralização da toxina objetivando a especificação do seu tipo. Para tal, as colônias isoladas foram re-inoculadas nos mesmos meios antes citados, submetidas à diluição e neutralizadas com as antitoxinas homólogas A, B, C, D e E. (Instituto Pasteur - Paris) incubadas por 30 minutos a 37°C e novamente inoculadas em triplicatas de camundongos. Cinco grupos de camundongos foram inoculados com 0,5 mL de: a) material não tratado para controle positivo, b) com antitoxina A, c) com antitoxina B, d) com antitoxina C, d) com antitoxina D, e) com antitoxina E e f) com material submetido a tratamento térmico de inativação como controle negativo. O tipo específico da toxina foi determinado quando o camundongo inoculado sobreviveu com a antitoxina homóloga à toxina presente na amostra, segundo DOWELL, (1984).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No exame necroscópico não foram observadas alterações macroscópicas evidentes. No teste de inoculação em camundongos ocorreram sinais de botulismo (cintura de vespa) e posterior morte dos animais por paralisia flácida. Amostras provenientes do soro, da ração, da água e da cama dos frangos

não provocaram a morte dos camundongos. Foram positivas as amostras de fígado, conteúdo da moela e inglúvio das aves. Colônias isoladas suspeitas de *Clostridium botulinum* apresentaram bioquímica compatível com a da espécie. Por sua vez, a análise com a antitoxina revelou positividade para toxina botulínica tipo C.

O botulismo ocorre com mais frequência em animais que em humanos, acarretando grandes perdas ambientais e econômicas (CRITCHLEY, 1991). Surtos acometem várias espécies em todo o mundo: bovinos (SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 1990b; LIVESEY *et al.*, 2004), eqüinos (SCHOENBAUM *et al.*, 2000, cães, gatos ELAD *et al.*, 2004) e certamente aves silvestres e domésticas (SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 1990c; SCHOCKEN-ITURRINO, 2007).

As formas vegetativas de *Clostridium botulinum* produzem as mais potentes toxinas conhecidas e diferem entre si segundo a antigenicidade apresentada. Nos animais destacam-se os tipos C e D, sendo o tipo C o mais freqüente em casos de intoxicação de aves (ELAD *et al.*, 2004). Nesta investigação o *Clostridium botulinum* produziu toxina do tipo C. Os sinais clínicos encontrados nestas aves vêm de encontro ao descrito na literatura, pois os animais apresentaram principalmente paralisia flácida e posição anormal da cabeça. Houve paralisia cardiorrespiratória e os animais foram a óbito por asfixia. Segundo MEUNIER *et al.*, (2002) e HUTZLER, (2005), a toxina botulínica cliva e inativa proteínas celulares específicas e essenciais para a liberação do neurotransmissor acetilcolina. Conseqüentemente, ocorre neuroparalisia, seguida de complicações cardiorrespiratórias, que podem levar à morte.

Uma alternativa prática que vem sendo adotada em granjas com alta mortalidade é o uso da compostagem. Esse processo biotecnológico é realizado em meio formado de resto de carcaças, cama e outros, nos quais ocorrem sucessivas atividades aeróbias e anaeróbias (fermentação). Este processo tem como finalidade a inativação de patógenos e permite a recuperação parcial de custos com a venda do produto resultante deste processo (KIEHL, 1998).

Neste surto de botulismo houve a morte de inúmeros animais do lote (3000 animais em 48 h). Esporos de *Clostridium botulinum* estão normalmente presentes no ambiente, como solo, cadáveres e podem transitar naturalmente pelo intestino das aves como parte da microbiota sem causar danos à saúde do animal, pois não germinam. Os esporos são capazes de permanecer no meio ambiente por muito tempo e quando existe condição favorável ocorre a esporulação e a forma vegetativa produz a toxina que desencadeia a doença (CARTER, 1988). Esta situação foi observada neste caso, em que os

frangos estavam sendo criados sem ambientação adequada o que gerou elevadas temperaturas no galpão. A toxina botulínica é pré-formada no próprio ambiente, o que faz levar em consideração que as aves analisadas poderiam ter se intoxicado por alguma outra fonte de contaminação desconhecida, a água, a ração e a cama de frango apresentaram resultado negativo quanto à presença da toxina. HUBALEK e HALOUZKA (1991) relatam a possibilidade da intoxicação das aves através da ingestão de larvas de moscas presentes na cama e que podem conter a toxina.

A higiene do ambiente é fundamental para a prevenção desta enfermidade. Falhas no manejo como a presença de carcaças de aves ou excesso de umidade sob os bebedouros podem propiciar o desenvolvimento de esporos com a conseqüente produção de toxina (SCHOCKEN-ITURRINO, 2007). A superlotação de galpões na granja também deve ser levada em consideração, pois ocasiona estresse nos frangos diminuindo a defesa imunológica e deixando o animal susceptível (HARBOLA e KUMAR, 1990).

## CONCLUSÕES

Para que casos como o descrito neste trabalho possam ser evitados, faz-se necessário a melhoria nas atividades operacionais como a eliminação adequada das carcaças, além da conscientização dos criadores sobre as conseqüências que um manejo inadequado pode acarretar.

## REFERÊNCIAS

- ANDO, Y. Studies on germination of spores of clostridial species capable of causing food poisoning. I. Factors affecting the germination of spores of *Clostridium botulinum* type A in a chemically defined medium. **Journal Food Hygiene Society**, v.14, p.457-61, 1953.
- BLAIR, J.E.; LENNETE, E.H.; TRUANT, J.P. **Manual of clinical microbiology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1971, 727p.
- CARTER, G.R., **Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária**, ed. ROCA, 1º ed., São Paulo, p.128-135, 1988.
- CRITCHLEY, E.M.R. A comparison of human and animal botulism: a review. **Journal of Research Society of Medicine**, v.84, p.26-29, 1991.

Intoxicação natural por *Clostridium botulinum* tipo "C" em grupo de aves domésticas

- DOWELL, V.R. Botulism and tetanus: selected epidemiologic and microbiologic aspects. **Reviews of Infections Diseases**. v.6, p.202-207, 1984.
- ELAD, D.; YAS-NATAN, E.; AROCH, I.; SHAMIR, M.H.; KLEINBART, S.; HADASH, D.; CHAFFER, M.; GREENBERG, K.; SHLOSBERG, A. Natural *Clostridium botulinum* Tipo C Toxicosis in a Group of Cats. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, p.5406-08, 2004.
- HARBOLA, P.C.; KUMAR, A.A. Clostridial infections in animals. **Indian Veterinary Medical Journal**, v.14, p.162-66, 1990.
- HUBALEK, Z.; HALOUZKA J. Persistence of *Clostridium botulinum* type C toxin in blow fly (*Calliphoridae*) larvae as a possible cause of avian botulism in spring. **Journal of Wildlife Disease**, v.27, p.81-5, 1991.
- HUTZLER, R.U. Botulismo. In: COURA, J.R. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.1563-1566. 2005.
- KIEHL, E.J. **Manual de compostagem**: maturação e qualidade do composto. Piracicaba: E.J. Kiehl, 1998, 171p.
- LIVESEY, C.T.; SHARPE, R.T.; HOGG, R.A. Recent association of cattle botulism with poultry litter. **Veterinary Research**, v.154, p.734-35, 2004.
- MEUNIER, F.A., HERREROS, J., SCHIAVO, G., Molecular mechanisms of action of botulinal neurotoxins and the synaptic remodelling they induce *in vivo* at the skeletal neuromuscular junction. In: **Handbook of neurotoxicology**, Humana Press, vol.1, New Jersey, p. 305-347, 2002.
- SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ÁVILA, F.A.; BERCHIELLE, S.C.P.; HARA, C.H.; MARQUES, L.C. Cama de frango contaminada com toxina botulínica. **Ciência Veterinária**, v.4, p.11, 1990a.
- SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; AVILA, F.A.; BERCHIELLI, S.C.P.; NADER FILHO, A. First case of type A botulism in zebu (*Bos indicus*). **Veterinary Record**, v.3, p.217-218, 1990b.
- SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; AVILA, F.A.; BERCHIELLI, S.C.P.; HARA, C.H.; MARQUES, L.C. AMANCIO, L.R. Cama de frango contaminada com toxina botulínica. **Ciência Veterinária**. 4, 11-12, 1990c.
- SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Clostridioses Aviárias. In ANDREATTI FILLHO, R. L. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo, Roca, p.133-143. 2007.
- SCHOENBAUM, M. A.; HALL, S. M.; GLOCK, R. D.; GRANT, K.; JENNY, A. L.; SCHIEFER, T. J.; SCIGLIBAGLIO, P.; WHITLOCK, R. H. An outbreak of type C botulism in 12 horses and a mule. **Journal of American Veterinary Association**. v.217, p.365-68, 2000.
- SMITH, L. D. S. **Botulism the organism its toxins disease**. Springfield: Charles & Thomas, 1977, 236p.

Recebido para publicação:

21/05/2007

Aprovado:

26/09/2007