

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**"PRESENTACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE INTOXICACIÓN POR
CLOSTRIDIUM BOTULINUM EN BOVINOS ESTABULADOS"**

Por

**ALVAREZ VIERA, Mary Claudia
ARRIECHE GONZÁLEZ, Pía Daniela**

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

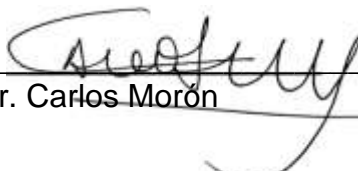
MODALIDAD Estudio de caso

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

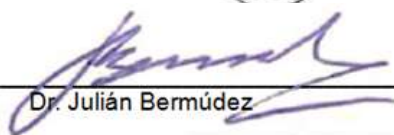
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



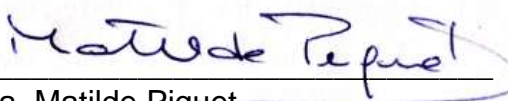
Dr. Carlos Morón

Segundo miembro (tutor):



Dr. Julián Bermúdez

Tercer miembro:



Dra. Matilde Piquet

Fecha: 22 de diciembre de 2016

Autores:

Br. Mary Claudia Alvarez Viera

Br. Pía Daniela Arrieche González

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor el Dr. Julián Bermúdez, por su paciencia y dedicación durante el curso de este trabajo, compartiendo con nosotras su conocimiento y experiencia.

Al Dr. Raúl Oyenard que aceptó ser parte de este proyecto y brindarnos la información necesaria para llevarlo a cabo.

A los Dres. Alejandro Rodríguez, Rafael Silva, Daniel Salada, Milton Cattáneo y Pablo Esposito, quienes colaboraron con material y buena predisposición a nuestras consultas.

A las funcionarias de biblioteca y bedelía de Facultad de Veterinaria por su infinita paciencia y prontitud de respuesta.

Al Laboratorio Santa Elena-Virbac que nos proporcionarnos información y material para la descripción del caso.

A los amigos que nos dejó el paso por esta Casa de estudio.

A nuestras familias y amigos por el apoyo incondicional durante toda la realización de la carrera.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
1. RESUMEN	7
2. SUMMARY	8
3. GENERALIDADES DE CLOSTRIDIOS	9
4. BOTULISMO:	13
4.1. Definición	13
4.2. Sinónimos	13
4.3. Antecedentes.....	13
4.3.1. Antecedentes a nivel mundial.....	13
4.3.2. Antecedentes en la región	16
4.3.3. Antecedentes en Uruguay:	17
5. ETIOLOGIA	21
5.1 Agente etiológico: <i>Clostridium botulinum</i>	21
5.2. <i>Clostridium botulinum</i>	22
5.3. Esporas	23
5.4. Toxinas.....	24
6. EPIDEMIOLOGÍA	25
6.1. Botulismo por pica	26
6.2. Botulismo del forraje.....	28
6.3. Botulismo asociado a carroña	28
6.4. Botulismo de las heridas.....	29
6.5. Botulismo visceral.....	29
6.6. Factores de riesgo.....	29
7. PATOGENIA	30
8. PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN BOVINOS	32
8.1. Evolución del cuadro clínico.....	32
8.2. Síntomas clínicos.....	32
9. PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN OTRAS ESPECIES	36
9.1. Equinos.....	36
9.3. Aves	37
9.4. Cerdos.....	39
10. DIAGNÓSTICO	40
10.1. Muestras a remitir.....	40
10.3. Diagnóstico presuntivo	41
10.4. Diagnóstico definitivo	42
10.4.1. Siembra y aislamiento	42
10.4.2. Pruebas bioquímicas	43
10.4.3. Histopatología	43
10.4.4. Bioanálisis	44
10.4.5. Elisa indirecto	46
10.4.6. Microfijación del complemento	47
10.4.7. Inmunodifusión	48
10.4.8. Radioinmunoensayo	48
10.4.9. PCR.....	48
10.4.10. Técnica de inmunofluorescencia	48
11. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	50
12. TRATAMIENTO	52
13. INMUNOPROFILAXIS Y MÉTODOS DE CONTROL	53
13.1. Inmunización	55

13.2. Esquema de vacunación	57
ESTUDIO DE CASO: MORTALIDAD DE BOVINOS EN CONFINAMIENTO.....	59
15. HIPÓTESIS.....	59
16. OBJETIVO GENERAL	59
16.1. Objetivos particulares	59
17.1. Predio en estudio.....	59
17.2. Epidemiología	59
17.3. Motivo de consulta	61
17.4. Antecedentes del caso	61
17.5. Descripción de la sintomatología clínica.....	64
17.6. Metodología de diagnóstico realizada.....	66
17.6.1. Necropsia a campo:.....	66
17.6.2. Diagnóstico de Laboratorio:.....	68
17.7. Tratamiento y medidas de control.....	70
18. RESULTADOS	71
19. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	73
ANEXO 1: Vacunas Clostridiales registradas en Uruguay.....	76
ANEXO 2: Informe de necropsia, División Laboratorios Veterinarios (MGAP), Regional Este (Treinta y Tres), 2013.....	78
21. BIBLIOGRAFÍA.....	79

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Características comparativas de enfermedades Clostridiales.....	10
Tabla 2. Enfermedades Clostridiales diagnosticadas en Uruguay.....	12
Tabla 3. Características bioquímicas entre los cuatro grupos de <i>Clostridium botulinum</i>	23
Tabla 4. Toxinas de <i>Clostridium botulinum</i> , animales susceptibles y sus toxina.....	25
Tabla 5. Diagnóstico diferencial de Botulismo en rumiantes.....	50
Tabla 6. Plan de vacunación tentativo para bovinos.....	58
Tabla 7. Categorías de animales en engorde.....	62

FIGURAS

Figura 1. Toxigenicidad e invasividad de las especies Clostridiales.....	11
Figura 2. Ubicación de los casos de Botulismo en el terreno nacional.....	21
Figura 3. Botulismo por pica en bovinos.....	27
Figura 4. Mecanismo de acción de la toxina botulínica.....	31
Figura 5. Bloqueo de la liberación de acetilcolina.....	32
Figura 6. Sintomatología concurrente con Botulismo.....	35
Figura 7. Bovino con parálisis del tren posterior.....	35
Figura 8. Equino con parálisis lingual por Botulismo.....	37
Figura 9. Muerte de ave por Botulismo.....	38
Figura 10. Canino con sintomatología de Botulismo.....	39
Figura 11. Prueba biológica.....	44
Figura 12. Prueba biológica de la actividad de toxinas botulínicas. Ratón con sintomatología compatible con Botulismo a la derecha, a la izquierda ratón control....	45
Figura 13. Seroneutralización para diagnóstico de Botulismo.....	45
Figura 14. Instalaciones de feed lot, donde se encontraban los terneros.....	60
Figura 15. Fuente de agua.....	60
Figura 16. Ternera en decúbito esternal.....	61
Figura 17. Mixer del establecimiento agropecuario.....	63
Figura 18. Cronología de los animales afectados.....	64
Figura 19. Animales en diferentes estadios de la enfermedad.....	65
Figura 20. Bovino con protrusión de lengua.....	65
Figura 21. Parálisis de los párpados.....	66
Figura 22. Impacción de Librillo (omaso).....	67
Figura 23. Grupo de animales muertos por Botulismo.....	70
Figura 24. Fosa Sanitaria.....	71
Figura 25. Colonias de <i>Clostridium botulinum</i> en medio Agar sangre.....	72
Figura 26. Medio de enriquecimiento Cooked Meat.....	72

1. RESUMEN

El Botulismo es una enfermedad de los animales y el hombre que se produce por la intoxicación con la toxina de *Clostridium botulinum*. Esta se produce por osteofagia (pica) debido a la carencia de fósforo o a partir de alimentos contaminados. El motivo de este estudio es la descripción de un brote colectivo de Botulismo en bovinos en confinamiento. Los animales afectados fueron terneros y vacas en engorde que se alimentaban con silo de alfalfa y moha, grano húmedo de sorgo y núcleo proteico. Estos presentaban parálisis flácida, postración y decúbito esternal. Se remitió material al Laboratorio de Facultad de Veterinaria UdelaR, identificándose la toxina en contenido de ciego y suero sanguíneo por seroneutralización, y se aisló *Clostridium botulinum* tipo D, siendo negativas las muestras de alimento y agua. Los síntomas clínicos y los resultados de laboratorio confirmaron Botulismo. Se recomienda considerar el uso preventivo de vacunas que contengan toxoide botulínico tipo C y D cuando se alimenta a los bovinos en forma intensiva. Los casos que se dan en bovinos en confinamiento no se han diagnosticado en Uruguay, pero es frecuente en países en donde se utiliza esta metodología de engorde.

2. SUMMARY

Botulism is a disease of animals and humans caused by poisoning *Clostridium botulinum* toxin. Osteophagy disease occurs due to lack of phosphorus or contaminated food. The reason for this study is the description of a collective outbreak of botulism in confined cattle. The affected animals were calves and fattening cows fed with hay and moha, moist sorghum grain and protein core. The animals had flaccid paralysis, prostration and sternal recumbency. Material was sent to the Veterinarian University Laboratory being identified the toxin in serum and cecum contents by serum neutralization. *Clostridium botulinum* type D was isolated, being negative food and water samples. Clinical symptoms and laboratory results confirmed botulism. It is recommended the use of vaccines containing botulism toxoid type C and D as prevention when fed cattle in an intensive way. The cases occurred in cattle in confinement have not been diagnosed in Uruguay, but it is frequent in countries where this fattening methodology is used.

3. GENERALIDADES DE CLOSTRIDIOS

Las enfermedades clostridiales constituyen un grupo de enfermedades causadas por el ataque de bacterias del género *Clostridium* y sus toxinas, razón por la cual reciben el nombre de toxico-infecciones, hallándose ampliamente difundidas en la naturaleza. Estas bacterias tienen la capacidad de sobrevivir por mucho tiempo en el ambiente, suelo, sedimentos marinos y pasturas en descomposición (Robles, 1998).

Las clostridiosis han estado presentes en el mundo desde la antigüedad, caracterizándose por ser súbitas, no contagiosas, con alta mortalidad, produciendo generalmente brotes, aunque bajo ciertas condiciones pueden producir muerte en forma de goteo (De Freitas, 1987; Robles, 1998; Radostits y col., 2002; Uzal, 2008). Usualmente, forman parte de la flora normal del intestino, y su población es controlada bajo condiciones normales por el resto de la flora intestinal en diversas especies de animales (Robles, 1998).

Requieren condiciones de anaerobiosis para su crecimiento y desarrollo. Presentan forma bacilar, con esporas generalmente deformantes, y toman positivamente la coloración de Gram. Son telúricos, nitrificantes y productores de gas (De Freitas, 1987; Robles, 1998; Radostits y col., 2002; Uzal, 2008).

Ya que el contacto con el oxígeno resulta letal para los microorganismos anaerobios, en el caso de los Clostridios, la capacidad de formar esporas asegura su sobrevivencia y la diseminación en el medio (Carlioni, 2007). De esta forma adquieren la capacidad de permanecer en vida latente por largos períodos de tiempo en el suelo y objetos inanimados, siendo altamente resistentes a los cambios ambientales y a los desinfectantes (Robles, 1998).

Las esporas de Clostridios al ser ingeridas por los animales, llegan al intestino e hígado, diseminándose por los músculos a través de la circulación sanguínea, permaneciendo en el cuerpo sin provocar manifestación clínica alguna, hasta que se presenten las condiciones apropiadas para su desarrollo. Cuando se rompe el equilibrio tisular que permite obtener las condiciones de anaerobiosis necesarias para la reproducción bacteriana activa y posterior secreción de sustancias venenosas poderosas denominadas toxinas (Robles, 1998).

Todas las especies del género *Clostridium* son productoras de exotoxinas, que por su actividad biológica son las responsables de la patogenicidad. La identificación y caracterización están dadas por la actividad de las toxinas, además de evidenciarse por los efectos producidos en animales de laboratorio, sobre cultivo de tejidos, o in vitro, detectando la degradación de distintos sustratos sobre los que actúan como enzimas. Luego que las toxinas son secretadas al medio que las rodea, son absorbidas por el medio interno (toxemia), alcanzando zonas de acción específica y ejerciendo su acción patógena mediante alguno de estos procedimientos:

- Hidrolizando componentes esenciales de la integridad de los tejidos, como la lecitina y el colágeno.

- Alterando la permeabilidad capilar y produciendo como consecuencia edemas.
- Hemólisis.
- Hidrolizando las uniones trabeculares de los tejidos a través de hialuronidasas.
- Produciendo neurotoxinas que bloquean la liberación de acetilcolina en las terminaciones nerviosas (De Freitas, 1987; Carloni, G., 2007).

Existen en la literatura distintas clasificaciones de las enfermedades histotóxicas producidas por Clostridios. Se presenta a continuación una clasificación basada en el tipo de enfermedad producida (tabla1).

Tabla 1. Características comparativas de enfermedades Clostridiales.

Enfermedad	Causa	Cuadro Clínico
Forma Súbita		
Clostridiosis	<i>Clostridium perfringens</i> tipo D, <i>Clostridium chauvoei</i> , <i>Clostridium novyi</i> , <i>Clostridium sordellii</i> , <i>Clostridium haemolyticum</i>	Muerte súbita sin signos en animales de carne o leche, confinados o a pastoreo, terneros o adultos. También ocasionan muerte en ovinos y caprinos.
Forma Muscular		
Carbunco Sintomático	<i>Clostridium chauvoei</i>	Inflamación serohemorrágica, caliente que produce depresión, toxemia y fiebre.
Edema Maligno	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>Clostridium novyi</i> tipo B	Edema alrededor de la herida, cojera, depresión, fiebre, de la herida escapa líquido sanguinolento. Hay gas y crepitación.
Forma Nerviosa		
Tétanos	<i>Clostridium tetani</i>	Rigidez en músculos maceteros, cuello, miembro posterior y alrededor de la herida, aumento de la sensibilidad, convulsiones mecánicas, trismo, cola recta, protrusión de tercer parpado, caminar envarado, dificultad para girar y retrocede. Muerte por asfixia.
Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>	Parálisis flácida progresiva, protrusión de lengua, la muerte sobreviene después de echado el animal, entre las 6 a 72 horas por asfixia.
Forma Digestiva		
Enterotoxemia	<i>Clostridium perfringens</i> Tipo D	Excitación, incoordinación, convulsiones, opistótonos, diarrea acuosa con o sin sangre, muerte súbita.
Síndrome Hemorrágico Adultos	<i>Clostridium perfringens</i> Tipo A	Diarrea hemorrágica ocasional, enteritis necrótica, destrucción de las vellosidades, necrosis isquémica del intestino delgado.
Hemoglobinuria bacilar	<i>Clostridium haemolyticum</i> (<i>Clostridium novyi</i> Tipo D).	Muerte súbita, sin signos, algunos animales presentan depresión, fiebre, dolor abdominal, disnea, hemoglobinuria, anemia e ictericia.

Fuente: Pino y Sánchez (2005). Modificado. Manual de Ganadería Doble Propósito, Enfermedades Clostridiales. Disponible en:

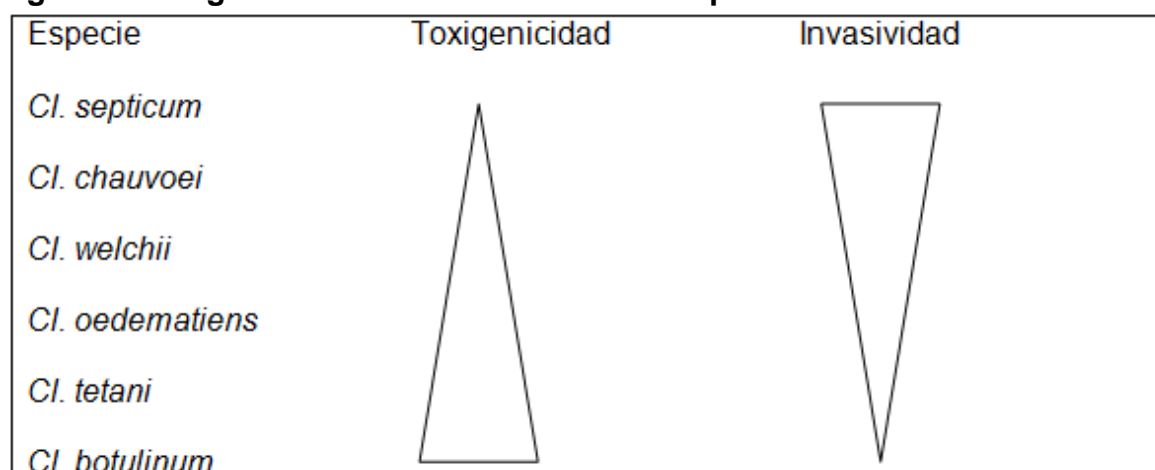
http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion5/articulo13-s5.pdf

También es posible clasificarlos según su capacidad invasiva en dos grupos:

- No invasores o toxico-infecciosas, caracterizados por tener poco poder de multiplicación en tejidos vivos, y ser productoras de toxinas muy potentes. Dentro de ellos están incluidos los agentes causales de Tétanos y Botulismo. En la figura 1 se puede observar la relación existente entre la toxicidad y la invasividad de las especies de *Clostridium*.
- Invasores, con gran capacidad para colonizar tejidos, productoras de toxinas de variada potencia sin llegar a la toxicidad de los agentes no invasores. Incluye a las especies causantes de Mancha, Edema Maligno y Enterotoxemia (Uzal, 2008).

Algunas toxinas pueden ingerirse pre-formadas en el alimento, como ocurre en el caso de la toxina botulínica. Otras pueden ser absorbidas desde el intestino posterior a una proliferación anormal del microorganismo causal en las vías digestivas, hecho que ocurre en la mayoría de los cuadros de enterotoxemias. En otros casos, como sucede con el Carbunco Sintomático o en Gangrenas gaseosas, las formas vegetativas del microorganismo elaboran toxinas cuando las esporas germinan en los tejidos. Estas toxinas ejercen su acción en forma local sobre los tejidos lesionados, se absorben y se difunden produciendo una toxemia generalizada que induce la muerte del individuo afectado. Por último, otras infecciones se desarrollan de forma local, con elaboración de potentes toxinas que actúan a distancia como en el Tétanos, la Hemoglobinuria Bacilar y también en algunos tipos de Enterotoxemias (Carlóni, 2007).

Figura 1. Toxigenicidad e invasividad de las especies Clostridiales.



Fuente: Gil Turnes (1976). Clostridiosis de importancia económica en los bovinos.

3.1 Clostridiosis en el Uruguay:

La mayoría de las enfermedades Clostridiales que afectan a bovinos y ovinos fueron identificadas en nuestro país. En la siguiente tabla (tabla 2) se muestran en detalle los agentes que fueron aislados en Uruguay.

Tabla 2. Enfermedades Clostridiales diagnosticadas en Uruguay.

Enfermedad	Agente etiológico	Aislamiento identificación agente	y/o del	Especie	Ocurrencia en Uruguay
Mancha	<i>Clostridium chauvoei</i>	Dr. Casas Olascoaga, 1961-Dr. Leaniz, 1964		Bovino 6 meses - 2 años	XXXX
Gangrena gaseosa	<i>Clostridium chauvoei</i>	Dr. Casas Olascoaga, 1961-Dr. Leaniz, 1964		Bovino Ovino	- XXXX
	<i>Clostridium septicum</i>	Dr. Casas Olascoaga, 1961-Dr. Leaniz, 1964		Bovino Ovino	- XX
	<i>Clostridium sordellii</i>	Dr. Quiñones – 1992		Bovino	X
	<i>Clostridium perfringens tipo A</i>	Dr. Leaniz, 1964		Bovino	X
Enterotoxemias	<i>Clostridium perfringens tipo A</i>	Dres. Cattáneo- Bermúdez, 2013		Ovino	X
		Dres. Cattáneo-Dutra- Bermúdez, 2013*		Bovino	X
	<i>Clostridium perfringens tipo B</i>	Dres. Cattáneo- Bermúdez, 2013		Bovino	X
	<i>Clostridium perfringens tipo C</i>	Beta toxina positivo (sin publicar)			
	<i>Clostridium perfringens tipo D</i>	Dr. Casas Olascoaga, 1961-Dr. Leaniz, 1964		Ovino	XXXX
	<i>Clostridium sordellii</i>	Dr. Bermúdez, 1997 (sin publicar)		Bovino	X
Hepatitis necrótica	<i>Clostridium novyi tipo B</i>	Dr. Casas Olascoaga, 1961-Dr. Leaniz, 1964		Ovino	XX
Hemoglobinuria Bacilar	<i>Clostridium haemolyticum</i>	Dres. Perdomo – Carreto, 1984		Bovino	XX
Tétanos	<i>Clostridium tetani</i>	Dr. Bermúdez, 1981 (sin publicar) (clínica e identificación de toxina)		Bovino	X
	<i>Clostridium tetani</i>	Dr. Bermúdez, 1981 (clínica e identificación de la toxina)		Ovino	XXXX
Botulismo	<i>Clostridium botulinum tipo D</i>	Dr. Bermúdez, (clínica y presencia de toxina)		Bovino	XX

Fuente: Bermúdez y Cattáneo, 2013. Comunicación personal.

*Caso de yeyunitis hemorrágica en bovino (primera identificación).

XXXX: MUY FRECUENTE

XXX: MEDIANAMENTE FRECUENTE

XX: POCO FRECUENTE

X: ESPORÁDICO

El carácter ubicuo de estos microorganismos hace que la erradicación de las enfermedades producidas por el género *Clostridium* sea prácticamente imposible, lo cual implica la necesidad de aplicar medidas de control para su correcta contención (Radostits y col., 2002).

4. BOTULISMO:

4.1. Definición

El Botulismo es una afección de origen tóxico de los animales domésticos y el hombre, causada por la ingestión de diferentes toxinas producidas por el *Clostridium botulinum* (Bermúdez y col., 1991, 2007). Sin embargo, algunas de estas toxinas presentan mayor importancia en los animales, y la prevalencia de un tipo determinado varía geográficamente (Melling y Alder, 2000; Radostits y col., 2002).

Esta patología se denomina Botulismo (latín *botulus*), que significa embutido.

Se sospecha de la enfermedad desde varios siglos antes de Cristo, pero no es hasta el siglo XIX que se estudió con mayor intensidad principalmente en el hombre, a raíz de intoxicaciones por productos cárnicos de varias especies animales, así como también por conservas de origen vegetal (Smith, 1980).

4.2. Sinónimos

La sinonimia de esta noxa varían dependiendo del país y especie afectada, es así que encontramos el término "Alantiasis", proveniente del griego *alantox*, que significa embutido; "limberneck" (Botulismo de las aves), "lamsiekte" (Botulismo de los bovinos en Sudáfrica), " Forraje Poisoning" en EE.UU. (Cattáneo y Bermúdez , 2006). En Brasil es llamada " Doença da mão dura" o "Mal de Alegrete", mientras que en Argentina es nombrado "Mal del Aguapey" debido al paraje donde ocurrieron los primeros casos (Zurbriggen y col., 1985).

4.3. Antecedentes

4.3.1. Antecedentes a nivel mundial

Los primeros casos de Botulismo fueron comunicados en humanos por Kerner en 1820, y Van Ermenger, médico belga que estudio en 1896 un caso de esta dolencia, que se caracterizó por presentar una alta mortalidad, y en consecuencia, provocó la muerte en un alto número de personas que habían ingerido jamón crudo y salado (Cattáneo y Bermúdez, 2006).

A través de estos importantes estudios se logró caracterizar la enfermedad:

- 1) Se trata de una intoxicación.
- 2) La toxina se ingiere con el alimento y no se inactiva con los procesos digestivos normales.

3) La toxina es producida específicamente por la bacteria *Clostridium botulinum*.

4) La toxina es relativamente resistente a los agentes químicos suaves, pero es sensible a la inactivación por el calor.

5) Que no todas las especies animales son susceptibles a la enfermedad (Leaniz y Calvo, 2003).

En animales domésticos el Botulismo fue descrito en 1910 por Meyer, en gallinas. Los caballos y mulos fueron los mamíferos en los que se describió por primera vez el Botulismo en forma de "intoxicación por pienso" por Buckley y Shippen en 1917. En 1921, Graham y Schwareze sugirieron que el Botulismo ocurría en ganado bovino, pero no fue claramente descrito en esta especie hasta que Seddon en 1922, lo describió con detalle en Australia. El Botulismo en las ovejas fue intensamente estudiado en este país, principalmente en la zona occidental por Bennett (1928), y en África del Sur por Bekker y Rossouw (1930). Se ha encontrado incluso entre los carnívoros, pues fue detallado en zorros por Pyle y Brown en el año 1939, y en perros por Legroux y Levaditi (1947) (Smith, 1980).

Müller publicó en 1963, un artículo dando reseña de dos enfermedades, la llamada "Tifus raquídea en equinos" y la "Parálisis bulbar contagiosa en el ganado", las cuales, en Dinamarca estaban presentes desde hacía casi cincuenta años. Los resultados de las investigaciones indicaron también la fuente más probable de la toxina responsable, siendo estos la contaminación de los piensos, por ejemplo heno, paja, ensilado, por canales de pequeños roedores descompuestos y especialmente de gatos.

El tifus raquídeo en caballos había sido descrito en 1855 por Stockfleth, citado por Müller (1963) en el Royal Agricultural College Veterinary, en Copenhague (Dinamarca). Entre el año 1959 y el 1963, fueron investigados a nivel de laboratorio un total de 77 focos sospechosos de ambas enfermedades, en 32 de los focos se evidenció *Clostridium Botulinum* y su toxina. También fue posible demostrar la presencia del microorganismo, su toxina o ambos, en el pienso utilizado para la alimentación de los animales, que se encontraba contaminado por la presencia de cadáveres de gato (Müller, 1963).

Un informe de Queensland (Australia) entre los años de 1922 y 1923, describe por primera vez un brote de Botulismo, llamada "parálisis del ganado". A partir de 1957, el *Clostridium botulinum toxina tipo D*, fue detectado en el contenido intestinal del ganado en ocho propiedades costera en Queensland, desde Maryborough a Townsville. El 11 de junio de 1960, la toxina del microorganismo fue detectada en contenido de yeyuno e íleon, pero no de duodeno, de una vaca de dos años. Para su estudio, las muestras obtenidas fueron sembradas. La toxina de esta cepa, se administró por vía subcutánea o por vía oral, produciendo en los animales de laboratorio muerte hiperaguda hasta formas leves de Botulismo en función de las tasas de dosis (Simmons y col., 1964).

El Botulismo rara vez se produce en los cerdos; en la literatura existe poca evidencia de las fuentes de toxina para esta especie. Beiers y Simmons (1964), registraron la muerte de cinco cerdos adultos luego de consumir cadáveres de peces del borde de una laguna en Queensland. Los mismos, presentaron la sintomatología característica de la enfermedad, parálisis flácida ascendente, y la muerte de los mismos sobrevino luego de transcurridas 19 a 52 horas post ingesta. La toxina botulínica tipo C, fue detectada en el contenido intestinal de los animales afectados.

Se constato un episodio de Botulismo en treinta vacas lecheras, cuatro vaquillonas, un toro, setenta y ocho cerdos y seis mulas en Lancaster Country (Pensilvania, EE.UU.), en mayo de 1984. El propietario había comenzado la alimentación del ganado con ensilaje de centeno, el cual había sido ensilado en un silo vertical, 3 semanas antes, usando como abono estiércol de cerdo. La sintomatología que presentaron los animales fue concurrente con Botulismo, por lo tanto se procedió a realizar la necropsia, sin hallazgos relevantes. Los resultados de laboratorio demostraron que dos de las tres muestras de silo dieron positivo a toxina preformada de *Clostridium botulinum* (30 DL50/g en ratones). Sin embargo, las muestras extraídas de los animales dieron negativos a las toxinas preformadas, no obstante se logró constatar la presencia de *Clostridium botulinum* en cultivos enriquecidos. Los resultados del laboratorio de muestras de ensilaje y muestras de suelo obtenidas del campo donde se recogió el ensilaje dieron positivas al *Clostridium botulinum*, pero la presencia del microorganismo y la toxina no se halló en las heces de los cerdos (Divers y col., 1986).

Prácticas como la alimentación de cama de pollo ensilado no es frecuente en Irlanda y muchos otros países. Ochenta de un grupo de ciento cincuenta bovinos de carne en feed lot, mostraron signos de Botulismo clásico en Irlanda del Norte después de ser alimentados con ensilado de cama de ave de corral. Sesenta y ocho de los animales murieron, detectándose en 18 de los 22 sueros examinados, *Clostridium botulinum* y la toxina tipo C. El microorganismo se aisló de la cama de los animales, y la toxina tipo C se identificó en carcasas de aves de corral descompuestas presentes en la cama. Hasta la fecha, este brote de Botulismo bovino fue el más grave registrado en Europa, y el primer caso asociado con la alimentación de bovinos con ensilado de cama de pollo, poniendo de manifiesto el grave riesgo de Botulismo en esta fuente de alimento (McLoughlin y col., 1988).

En un estudio realizado sobre un rodeo de ciento cinco vacas Holstein Friesian, en una granja en Bandirma en Balikesir (Turquía), se observó que veintiséis de ellas presentaron sintomatología coincidente con Botulismo. En el establecimiento se les ofrecía ensilaje de cama de aves a las vacas de ordeño, el resto de las categorías no se vieron afectadas debido a la alimentación diferenciada (sin ensilaje). Se recolectó suero, contenido intestinal y líquido ruminal de todos los animales afectados, muestras de los diferentes componentes de la dieta, así como también contenido de intestino delgado, yeyuno e íleon de cinco animales muertos. Las muestras de suero y cereales fueron negativas. Sin embargo al inocular en ratones contenido intestinal, líquido ruminal y ensilaje de cama de aves fue posible confirmar la enfermedad.

Esta es la primer confirmación mediante el aislamiento directo de toxina de *Clostridium botulinum* tipo C y D en ganado en el país (Senturk y Cihan y col., 2007).

Más recientemente, a nivel mundial, se presentó en el año 2010 un brote de Botulismo en una granja lechera de Austria, en seis vacas Simmental de un rebaño de veintinueve animales alimentados con ensilados. El brote fue diagnosticado clínicamente y posteriormente se confirmó la presencia de *Clostridium botulinum* tipo C y D por bioensayo en ratones

En este brote, uno de los animales afectados presentaba una gestación a término, por lo que se le realizó cesárea antes de la eutanasia. Este es el primer informe, en el cual un ternero nacido de una vaca gestante con Botulismo agudo no presenta la enfermedad (Kummel y col., 2012).

4.3.2. Antecedentes en la región

Hasta 1926 los antecedentes de Botulismo en América del Sur eran escasos. La bibliografía sobre la enfermedad se reduce a un comunicado de Pedro J. Pando (1926) sobre un caso en la especie humana, donde se intoxicaron y murieron siete personas en Provincia de Buenos Aires, República Argentina, tras la ingesta de conservas de chauchas, donde posteriormente fue aislado *Clostridium botulinum*. El mismo autor hace referencia a otro caso ocurrido en Mendoza, República Argentina, y que produjo la muerte de varias personas por ingesta de conservas de espárragos (Trenchi y col., 1949).

La primera descripción de la ocurrencia del Botulismo en Colombia se remonta a la década del setenta, cuando el Programa de Salud Animal del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1978), indicó en su informe anual la presencia de casos de Botulismo en inmediaciones del Centro Experimental Carimagua, donde se describió textualmente: “el bajo contenido de fósforo de estos suelos tropicales y de las gramíneas nativas, también conduce a la condición denominada “pica” o apetito desmedido, la cual predispone a los animales al Botulismo, una condición tóxica que, sin lugar a dudas, produjo la muerte a varios animales en este año...”. La ocurrencia de esta enfermedad en la región aparentemente se presentaba de forma esporádica (Ortiz y Benavides, 2002).

A partir de 2003 la enfermedad es reconocida también en Paraguay, Bolivia y Venezuela (Leaniz y Calvo, 2003).

En la República Argentina los antecedentes de la enfermedad en la especie bovina se reconocen desde 1978 en la provincia de Corrientes. El INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) de Mercedes tomó conocimiento del problema ese mismo año. Efectuándose estudios metabólicos, nutricionales, parasitarios, infecciosos y tóxicos. La sintomatología, la deficiencia de fósforo y ausencia de lesiones en la necropsia y estudios histológicos, orientaron al diagnóstico presuntivo de intoxicación botulínica. Se registró originariamente en la zona de Santo Tomé, en establecimientos aledaños al río Aguapey, de donde toma el nombre vulgar “Mal de Aguapey”.

La incidencia registrada en 1979 por la Agencia de Extensión Rural de Santo Tomé, en más de 20 establecimientos, osciló del 2,5 % hasta el 10 por ciento. Actualmente, causa importantes pérdidas económicas que llegan a un 2,4 % (Zurbriggen y col., 1986; Leaniz y Calvo, 2003).

En Brasil el Botulismo en bovinos, conocido también como "Doença da vaca caída", causa grandes pérdidas económicas, principalmente por el número de animales que mueren todos los años, relacionada principalmente con la deficiencia de fósforo presente en diversas zonas del país. Miles de animales mueren anualmente debido a esta enfermedad, la cual apareció inicialmente en Piauí, entre 1960 y 1970, observado por José Morgado (Rodrigues, 1995).

Mato Grosso do Sul donde la población bovina superaba los veintitrés millones de cabezas, el 17 % de los bovinos muertos entre 1996 y 1998 fue a causa de Botulismo (Riet-Correa y Gevehr, 2002).

Otros estados de las regiones Centro-oeste, Norte y Nordeste, el Botulismo es una de las tres enfermedades más frecuentes en los bovinos, sin existencia estimativa de las pérdidas económicas ocasionadas. En la región Sur, el Botulismo aparentemente tiene menor importancia. En Río Grande del Sur la población bovina asciende a trece millones de cabezas, donde la muerte por Botulismo entre 1978 y 1998 fue aproximadamente de 0,18 % según datos del Laboratorio Regional de Diagnóstico, Universidad Federal de Pelotas (Riet-Correa y Gevehr, 2002).

La enfermedad ha sido diagnosticada en ovinos y equinos, pero sin importancia económica en estas especies (Riet-Correa y Gevehr, 2002).

El Hospital de Clínicas Veterinarias de la Universidad Federal del Río Grande del Sur, fue atendido un canino macho, de 6 años, raza Pastor Alemán, con antecedentes de ingesta de carroña. Se llegó a un diagnóstico presuntivo de Botulismo basado en los datos anamnésticos y cuadro clínico característico (Faraon, 2007).

Se describe un caso de Botulismo por consumo de maíz contaminado en un sistema lechero, en régimen de confinamiento en la región del sur Minas Gerais, de ciento cuarenta y ocho vacas treinta y ocho fueron afectadas, con una letalidad del 100 % (da Costa y col., 2008).

Ortolani y colaboradores (1997), Dutra y colaboradores (2005) y da Costa y colaboradores (2008) describen casos de Botulismo en animales alimentados con cama de aves de corral. Dutra y colaboradores (2001) relatan la ocurrencia de casos de Botulismo en bovinos a consecuencia de agua contaminada en la región de San Pablo y Mato Grosso do Sul.

4.3.3. Antecedentes en Uruguay:

En nuestro país la enfermedad fue diagnosticada por primera vez en patos domésticos en la zona de Melilla, departamento de Montevideo, por los Doctores Szyfres, Trenchi y Abaracón en 1949. El productor informó que en un período de 2 años tuvo pérdidas casi totales (de aproximadamente doscientos

animales, solo quedaban veinticinco), produciéndose la enfermedad sobre todo cuando el nivel de agua del lago artificial del predio disminuía.

Se realizó en 1991 el primer comunicado sobre la detección de toxina botulínica en bovinos (Bermúdez y col., 1991). Desde febrero a abril de 1989 se presentó un período de sequía donde se registraron treinta muertes de un total de trescientos animales de cría en la localidad de Clara, en el departamento de Tacuarembó. La sintomatología clínica se describe con incoordinación, temblores musculares, dificultad respiratoria, con postración y muerte. Los resultados de la necropsia apuntaron a un diagnóstico presuntivo de enfermedades virales. Servicios de la División de Laboratorios Veterinarios DILAVE, Miguel C. Rubino, evidenció títulos de 1/8 a la SN (seroneutralización) de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, los análisis bioquímicos mostraron niveles de fosfatemia bajos. El diagnóstico de Botulismo fue confirmado a través de inoculación en ratones de contenido intestinal y la muerte de los mismos sobrevino en un período de 24 y 48 horas.

También ese año, durante la misma época, murieron veintinueve vacas, con una morbilidad del 10 % y una mortalidad del 100 por ciento. Las muertes se limitaron a un solo potrero, se remitió material consistente con sangre de cuatro animales sanos y dos enfermos. De acuerdo con la sintomatología clínica, los hallazgos de necropsia, y antecedentes, el profesional actuante realizó un diagnóstico presuntivo de intoxicación por toxinas de *Clostridium botulinum* (Bermúdez y col., 1991).

Ruiz y colaboradores en 1992 describieron un caso de Botulismo tipo C en caninos a partir de la ingestión de carcasa de pato (Bermúdez y col., 2011).

En la década del 90 se describe un brote de Botulismo en cerdos, en un establecimiento dedicado a la producción de los mismos, ubicado en el departamento de Treinta y Tres. Se vieron afectados más de cien animales, que se encontraban en decúbito. Luego de descartar diferentes enfermedades, se sospecho de Botulismo. Fueron remitidas al laboratorio para la confirmación del agente causal sangre, muestras de alimento y cascara de arroz, la que era utilizada como cama para los cerdos. En el laboratorio se realizó bioensayo en ratones con suero sanguíneo, los que presentaron sintomatología compatible con Botulismo. Posteriormente se realizó la tipificación con toxina C y D, las cuales dieron negativo (no se pudo realizar tipificación con otros tipos de toxina ya que el material remitido era escaso y no había otros tipos de toxina para enfrentarlos). Las muestras de alimento dieron negativo, al igual que la cama. Los cerdos muertos, fueron depositados en una cantera, de donde se recolectan larvas de moscas debido a la falta de material para continuar con el diagnóstico de laboratorio. Las larvas fueron maceradas e inoculadas en ratones, con resultados negativos, lo que dio indicios de la inexistencia de toxina preformada. Subsiguientemente se cultivo macerado de larvas de moscas en medio Tarozzi, se sembró por varios días (la toxina demora entre 48 a 72 hs). Al inocular en ratones el macerado del cultivo, estos presentaron sintomatología consistente con Botulismo. Este no solo es el primer caso descrito en cerdos en Uruguay, sino que es la primera vez que se utilizó para el diagnóstico de Botulismo larvas de mosca (Bermúdez, 2016).

Posteriormente en 2001, la enfermedad fue diagnosticada en el departamento de Artigas, en un establecimiento donde desde hacía cuatro años venían ocurriendo muertes en vacas de cría durante el verano (Riet-Correa y Gervehr., 2002).

Se hace referencia al primer caso de Botulismo en equinos en nuestro país en el 2006. Donde se produjo un brote en varios caballos y algunas aves de corral. Inicialmente se sospecho de un cuadro viral, posiblemente rabia. Uno de los equinos fue llevado a Facultad de Veterinaria - UdelaR en Montevideo, el mismo fue examinado por los Doctores Bermúdez y Carreto. El animal presentaba constipación con materia fecal muy dura, belfo caído, por lo que presentaba dificultad para beber agua y problemas locomotores. Se sospecha de Botulismo por la anamnesis, ya que los animales afectados comían desechos vegetales en descomposición de remolacha, cascara de verdura y papa. Se extrajo muestra de materia fecal, se suspendió en buffer de gelatina por 24 horas y se hizo inoculación en ratones, existiendo la presencia de la toxina. Se hizo la neutralización para la toxina botulínica y resulto positiva al *Clostridium botulinum* tipo D. El animal fue tratado y se recupero (Bermúdez, 2016).

Las Jornadas Técnicas Veterinarias llevadas a cabo en noviembre de 2007 en nuestro país, los doctores Bermúdez, Cattáneo y Baison realizaron la presentación de un caso de Botulismo en caninos. Se recibieron 10 muestras sospechosas, los animales presentaban sintomatología nerviosa que comenzaba en forma aguda, con decúbito lateral y parálisis flácida. Debido a la sospecha de presencia de la enfermedad, se remite a laboratorio suero sanguíneo, el cual fue procesado e inoculado en ratones, con siete resultados positivos. Durante esta Jornada fue expuesto también un caso de Botulismo en patos por la ingestión de alimento contaminado, en el departamento de Salto, en febrero del 2007. Donde se vieron afectados ciento ochenta y cinco animales de un total de doscientos, con disnea, parálisis flácida de cuello y patas, los cuales murieron 24 a 48 horas después. Se remitieron muestras de hígado, suero, contenido intestinal, ciego y agua de los bebederos. Las muestras fueron procesadas e inoculadas en ratones. Estos se inocularon con contenido de ciego y de las muestras de agua dieron positivo para Botulismo. Las esporas se encontraban en el agua, que luego de ser ingerida por los animales, en el intestino, las esporas producían la toxina (Bermúdez y col., 2007).

El Doctor Hernán Baco dio a conocer un caso de Botulismo bovino en el departamento de Rocha, en enero del 2011. En el paraje "El Caracol", predio de aproximadamente 200 hectáreas, que se encuentra ubicado a unos 400 metros de la costa oceánica. El motivo de consulta fue un animal en decúbito esternal, luego de presentar debilidad progresiva, con problemas locomotores y sialorrea. Al examinar la vaca, se observó mucosas color ladrillo, sin temperatura, respiración lenta (inspiración bifásica), el propietario le hizo saber al veterinario que muchos animales consumían piedras del borde del camino, y que hasta el momento de la consulta llevaban seis bovinos muertos, con la misma sintomatología. Todos los animales afectados se encontraban en el mismo potrero, donde la categoría predominante eran vacas paridas o

próximas a parir, conjuntamente con algunos novillos sobre año. Se realizó la necropsia de un novillo afectado, sin encontrarse datos relevantes. Debido a la sintomatología, anamnesis y datos de la necropsia se sospechó de intoxicación por *Clostridium botulinum* por deficiencia de fósforo (Baco, 2011).

Ese año, en el mes de noviembre, el Doctor Bermúdez y colaboradores (2011) describieron un caso clínico de Botulismo canino en el barrio de Paso Molino, departamento de Montevideo. El animal presentaba parálisis locomotora y ausencia de reflejos. Para el diagnóstico de laboratorio se envió sangre para SN (seroneutralización) en ratones, confirmando la enfermedad por la detección de toxina botulínica tipo C.

Hasta la fecha no se conoce evidencia de la presentación en forma relevante de esta enfermedad en ovino. Es poco frecuente en ovinos y caprinos, al punto de no haber sido diagnosticada en estas especies en Argentina o Uruguay; esto se puede deber a que los desbalances carenciales en ovinos son muy difíciles de encontrar (Radostits y col., 2002; Leaniez y Calvo, 2003).

Concluimos recalcando que el Botulismo es una enfermedad de los animales y del hombre que se produce por la intoxicación con la toxina botulínica. En la mayoría de las presentaciones lo que se produce es una intoxicación, pero también se puede dar una toxico-infección. La presentación del Botulismo enzoótico por osteofagia (pica) en bovinos debido a la carencia de fósforo, ha sido descrito en varios países incluyendo el nuestro (figura 2), siendo la más conocida de las intoxicaciones. Los casos que se presentan en bovinos en confinamiento no se habían diagnosticado en Uruguay, aunque es frecuente en países en donde se utiliza esta metodología de engorde (Bermúdez y col., 2006; Riet-Correa y Gevehr, 1998; Heider y col., 2011).

Figura 2. Ubicación de los casos de Botulismo en el territorio nacional.



Fuente de referencia disponible en: <http://web.renare.gub.uy/js/visores/coneat/>

5. ETIOLOGIA

5.1 Agente etiológico: *Clostridium botulinum*.

Clasificación taxonómica

- Phylum: Firmicutes
- Clase: Clostridia;
- Orden: Clostridiales
- Familia: Clostridiaceae
- Género: Clostridium
- Especie: Botulinum.
- Tipos: A, B, C, D, E, F y G.

La clase Clostridia, contiene una extensa variedad de bacterias Gram-positivas distribuidas en tres órdenes y once familias, dentro de las cuales, el género *Clostridium* es el más numeroso.

Prazmowski en el año 1880, agrupó las bacterias anaerobias estrictas del género *Clostridium* capaces de producir fermentación y esporular. Este género está constituido por más de cien especies, de las cuales veinte son patógenas y se asocian a enfermedades en el hombre y los animales (Cerrato y Valle, 2002).

Los Clostridios carecen de cadena respiratoria, obtienen su ATP (adenosin trifosfato) exclusivamente mediante fosforilación a nivel de sustrato, la división en sub grupos de este género, se basa en esta propiedad y en el sustrato utilizado. Algunos Clostridios fermentan azúcares, otros como el *Clostridium botulinum* obtienen su energía de la fermentación de aminoácidos, oxidando un aminoácido y empleando otro como aceptor de electrones, este proceso que recibe el nombre de reacción de Stickland (Madigan y col., 2004).

Son bacilos esporulados, anaerobios estrictos y la tolerancia al oxígeno varía según las especies. *Clostridium novyi* solo puede crecer en ambientes con menos de 0,5 % de oxígeno, pero la mayoría tiene exigencias intermedias soportando del 2 al 8 por ciento. Pueden crecer en intervalos de temperaturas, desde 4 °C para *Clostridium botulinum* del tipo E, hasta 69 °C para Clostridios termófilos. Para la mayor parte, la temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 37 °C (Cerrato y Valle, 2002).

La clasificación de los microorganismos pertenecientes a este género se ha establecido tradicionalmente de acuerdo con las características morfológicas, culturales y bioquímicas, asociadas a determinadas enfermedades.

En la actualidad, esta clasificación se basa en la homología existente en la secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico) del ARN (ácido ribonucleico) ribosómico 16 S, el contenido en guanina y citosina del ADN (% de G+C). Debido a la amplia diversidad en el porcentaje de G+C de las especies de *Clostridium*, podría dividirse a este género en dos grupos (Cerrato y Valle, 2002).

5.2. *Clostridium botulinum*

El *Clostridium botulinum*, es una bacteria productora de la toxina botulínica, agente causal del Botulismo, esta enfermedad es una intoxicación o tóxica infección de origen alimentario que se traduce en un cuadro clínico de parálisis.

Los encontramos frecuentemente en el suelo, sedimentos marinos y lagos. Puede ser aislado del contenido intestinal del hombre y de los animales, pero no forma parte de la micropoblación digestiva normal.

Es un bacilo Gram positivo, cuyo tamaño es de 0,5 a 2 µm de ancho y 1,6 a 22 µm de largo, pero pueden encontrarse formas mucho más grandes en algunos cultivos (Smith y Holdeman, 1968). Este *Clostridium*, posee esporas ovales en posición subterminal. Es móvil, presenta flagelos peritricos, no produce cápsula, es proteolítico y lipolítico (Cerrato y Valle, 2002).

En condiciones de cultivo, crece en anaerobiosis estricta, en medios sólidos forman colonias circulares de 1 a 6 mm de diámetro, con bordes irregulares, traslúcidos o semi opacos, rodeadas de una pequeña zona de hemólisis (Madigan y col., 2004). Su crecimiento se ve favorecido por la presencia en el medio de una fuente de carbono fermentable, y se inhibe con la adición de NaCl (cloruro de sodio) al 6,5 % y bilis al 20 por ciento. La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 30 y 37 °C. La mayoría de las cepas se

cultivan bien a 45 °C, excepto las de tipo E, cuya temperatura mínima de crecimiento es de 3,3 °C.

Las diferentes cepas presentan características bioquímicas variables, que permiten clasificarlas en cuatro grupos (tabla 3) (Cerrato y Valle, 2002).

Tabla 3. Características bioquímicas entre los cuatro grupos de Clostridium botulinum.

	GRUPO I Tipos A, B, F Proteolíticas	GRUPO II Tipos B, E, F No proteolíticas	GRUPO III Tipos C y D	GRUPO IV Tipo G (C. argentinense)
Proteasa	+	-	+d	+d
Gelatinasa	+	+	+	+
Acidificación de:				
Glucosa	+	+	+	-
Maltosa	-	+	+	-
Lactosa	-	-	-	-
Sacarosa	-	+	-	-
Lipasa	+	+	+	-
Productos terminales de fermentación de la glucosa	A, B, IV, IB	B, A	B, P, A	A, IV, IB
A: ácido acético; B: ácido butírico; P: ácido propiónico; IV: ácido isovalérico; IB: ácido isobutírico; d: débil.				

Fuente: Cerrato y Valle, (2002). Manual de microbiología veterinaria.

5.3. Esporas

Las esporas constituyen una forma de resistencia bacteriana. Le otorga la posibilidad de sobrevivir en condiciones adversas y pueden permanecer en el ambiente durante más de treinta años, en un estado latente hasta ser expuestas a condiciones que puedan sostener su crecimiento. Las podemos encontrar en el medio ambiente del bovino, sobre todo en tierra húmeda (borde de zanjas, tierras inundadas) (Freeman, 1986; Romero y col., 1995).

Tienen forma ovalada y se encuentran en posición subterminal deformando la célula vegetativa. Incubadas en anaerobiosis son grandes, con un diámetro de 5 a 10 mm, brillantes, con bordes traslucidos y un centro más espeso y oscuro. Son muy resistentes al calor, resisten a la ebullición durante períodos prolongados y para su destrucción se requiere calor húmedo a 120 °C. Prolifera en material vegetal o animal en estado de descomposición, en condiciones ambientales favorables de humedad, temperatura, pH mayor a 4,5, concentración de sales, medios enriquecidos nutricionalmente y sin oxígeno (Leaniz y Calvo, 2003; Dirksen y col., 2005).

En estas condiciones, presentan una rápida velocidad de crecimiento, donde las esporas germinan y la célula vegetativa se multiplica rápidamente, elaborando numerosas toxinas que son liberadas al producirse la lisis bacteriana. Estas exotoxinas constituyen la forma patógena del *Clostridium Botulinum*, ya que el mismo no es el causante de los daños, ni de la muerte del animal, sino que son sus diferentes tipos de toxinas (Robles, 1998).

5.4. Toxinas

Las toxinas son proteínas de alto peso molecular, biológicamente activas, constituidas por un componente neurotóxico combinado con proteínas no tóxicas, que sirven para proteger a esta neurotóxina de los efectos destructivos de otras proteínas y ácidos gástricos, antes de que se produzca su absorción (Madigan y col., 2004).

Son relativamente estables y altamente letales. Al ser ingerida vía oral o absorbida por tejidos, pasa al torrente sanguíneo, luego de la incubación, en pocas horas o en uno a dos días causa los primeros síntomas o la muerte. Parcialmente resistentes a los agentes químicos, pero sensibles al calor y desecación, rápidamente inactivadas por la luz solar (Riet-Correa y Gevehr, 2002).

Se considera la toxina de mayor potencia actualmente conocidas. Un gramo de toxina mata un animal adulto (Leaniz y Calvo, 2003).

Las toxinas del *Clostridium botulinum*, se clasifican en siete serotipos, inmunológicamente diferentes entre sí, se designan con letras griegas siguiendo el orden de descubrimiento, denominados tipo: A, B, C (alfa y beta), D, E, F y G. Todas estas toxinas tienen especial afinidad por el tejido nervioso.

Los serotipos A, B, E, y F son los principales responsables del Botulismo en humanos. Los tipos C (beta) con las toxinas C1, C2 y D están frecuentemente involucrados en la afección de los bovinos, ovinos y equinos, en estos últimos también se asocian los tipos A y B. En las aves como el pato, es común hallar el tipo A y C y en las gallinas B y C (alfa) (tabla 4) (Heidrich y col., 1976).

Las cepas de *Clostridium botulinum* pertenecen a los grupos I, II, III, IV de acuerdo a sus características fisiológicas (tabla 4).

En el humano las exotoxinas causantes de la enfermedad, son la A presente habitualmente en los vegetales, la B en los productos cárnicos, E y F presente en pescados y sus derivados, y todas se caracterizan por producir parálisis ascendente progresiva y simétrica. Los tipos C y D producen el Botulismo en aves y ganado bovino.

La toxina botulínica, es una metaloproteinasa que actúa sobre las membranas pre sinápticas de las uniones neuromusculares. Una vez unida a estos puntos segmenta las proteínas que participan en la descarga de acetilcolina en la sinapsis. El efecto principal de este bloqueo, es la parálisis del sistema motor, pero también produce disfunción del sistema nervioso vegetativo. Esto impide

que se produzca la contracción muscular y provoca la parálisis flácida y la muerte por asfixia, resultado del Botulismo (Radostits y col., 2002).

Tabla 4. Toxinas de *Clostridium botulinum*, animales susceptibles y sus toxina.

Toxinas	Especies susceptibles	Fuentes
Tipo A	Humano, aves.	Verduras, frutas, carne, pescado.
Tipo B	Humanos, equinos (vacas y pollos).	Carne y productos cárnicos, verduras, pescado.
Tipo C	Aves	Invertebrados muertos, gusanos, vegetales en descomposición y materiales de desecho.
	Bovinos, equinos, caninos (Cerdos y Humanos).	Cadáveres, ensilado de cama de pollo, estiércol de pollo como suplemento alimenticio, ensilaje de mala calidad en silo pack.
Tipo D	Bovinos, ovinos (Equinos y Humanos).	Carcasas, huesos.
Tipo E	Humanos, aves, peces.	Peces y subproductos y cultivo de peces en estanques con lodo en el fondo.
Tipo F	Humanos.	Embutidos y peces.
Tipo G	Humanos.	Suelo

Disponible en: Markey y col, (2013). Clinical Veterinary Microbiology.

6. EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad afecta diferentes especies domésticas y aves silvestres, pero los cerdos, los perros y los gatos, parecen ser más resistentes (Riet-Correa y Gevehr, 2002), no tiene limitaciones geográficas. En el bovino se presenta mundialmente en forma esporádica hasta enzootica. Se pueden producir casos aislados o brotes esporádicos en la mayoría de los países, el riesgo de contraer la enfermedad varía según la región, debido a las diferencias en el almacenamiento del pienso y prácticas de alimentación y manejo. Las razas cebuinas y sus cruza son más susceptibles a esta patología (Dirksen, 2005).

De esta manera los brotes asociados a ingestión de la toxina en piensos conservados son más frecuentes en los estados del norte de EE.UU. y en Europa, mientras que en los animales a pastoreo, se han descrito principalmente en Sudáfrica, Australia y en la zona de la costa del Golfo de EE.UU. La enfermedad afecta un gran número de animales de forma simultánea y presenta un elevado índice de mortalidad (Radostits y col., 2002).

Tanto para el hombre como para los animales la principal fuente de intoxicación es el alimento o agua contaminada, en donde se multiplica la bacteria y se produce la toxina. Estos se contaminan directa o indirectamente con *Clostridium botulinum* contenidos en restos de cadáveres. Otra fuente de contaminación son las camas de aves usadas para la alimentación del ganado, así como la utilización de esta en predadores que actúan como vehículo de contaminación sobre praderas (Dirksen y col., 2005).

Son susceptibles de contaminarse los mariscos o incluso las hortalizas o verduras sembradas en terrenos contaminados con las esporas de la bacteria (Forero, 2007).

En los bovinos la transmisión se realiza fundamentalmente a través de la ingestión de huesos, pastos o silos contaminados por la toxina (Leaniz y col., 2003).

La mayoría de los casos está relacionada con la ingestión de toxina preformada (Botulismo del forraje) y carroña contaminada por la toxina (Botulismo asociado a carroña). Algunas fuentes menos comunes, son el crecimiento del microorganismo y la producción de la toxina en heridas, supone herida necrótica que proporciona un medio anaerobio que puede permitir el crecimiento vegetativo de las esporas (Botulismo en heridas) y de la misma forma, en regiones anaerobias o necróticas del tracto gastrointestinal del paciente y absorción de la toxina hacia la circulación sanguínea (Botulismo toxico infeccioso) (Rebhun, 1999).

6.1. Botulismo por pica

La enfermedad se limita a aquellas zonas en las que el suelo es deficiente en fósforo, y tiende a presentarse en épocas del año en que la pastura contiene menor concentración de este mineral. Generalmente durante estaciones lluviosas, cuando la pastura crece rápidamente contiene suficiente fosfato para satisfacer las necesidades nutritivas de los bovinos, pero a medida que el pasto madura disminuye el contenido del mismo. El problema radica en que los bovinos solo aprovechan parte del fosfato, y en consecuencia presentaran síntomas de deficiencia de fósforo (Smith, 1980).

Otros factores que predisponen a la ocurrencia de este tipo de enfermedad en rumiantes, son el pH, la humedad y las condiciones anaerobias en el pienso, que permiten el crecimiento vegetativo del *Costridium botulinum* y la producción de sus toxinas.

Muchos animales son portadores asintomáticos en su intestino de *Costridium botulinum*, cuando mueren, el agente invade el organismo y producen gran cantidad de toxinas. Estas se depositan en los huesos, que son ingeridos por animales que sufren de pica (figura 3) (Riet-Correa y Gevehr, 2002).

El principal factor predisponente de Botulismo causado por la ingestión de huesos contaminados es la carencia de fósforo. En función de está, los animales desarrollan el habito de roer e ingerir fragmentos de huesos y tejidos de animales muertos en el campo, sea de otros bovinos o de animales silvestres (aves, carcasa de tatú y tortugas) donde el agente permanece viable por un año. Existe la posibilidad de que el animal este ingiriendo la toxina preformada en el cadáver y las esporas. Cuando este animal muera, servirá a la cadena epidemiológica de la enfermedad.

Dos factores determinan la intensidad de los brotes de Botulismo asociado a la ingestión de cadáveres, la intensidad de la osteofagia y el grado de contaminación de los cadáveres.

El Botulismo ocurre tanto en ganado de leche como en el de carne, causando mayores pérdidas económicas en estos últimos, sobre todo animales mayores a dos años, de ambos sexos, en su mayoría hembras de raza cebú y sus cruza, dado que los mismos presentan mayores requerimientos nutricionales (Riet-Correa y Gevehr, 2002).

Las categorías más afectadas, son las vacas en gestación o lactantes, condiciones ambas que aumentan la demanda de calcio y fósforo, la deficiencia se agudiza y la enfermedad asume carácter estacional (Smith, 1980; Riet-Correa y Gevehr, 2002).

Otra forma de intoxicación es dar a los animales cama de pollos, pastos o agua contaminada. En las aves puede deberse a la ingestión de alimentos mal procesados y conservados, por consumo de cadáveres de animales y por la ingestión de larvas de moscas de las canales descompuestas (Cattáneo y Bermúdez, 2006).

Figura 3. Botulismo por pica en bovinos.



Fuente: Benavides y col., 2011. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542011000100004

6.2. Botulismo del forraje

La forma de Botulismo conocida como intoxicación del forraje se presenta en muchos países en los que el ganado consume heno, especialmente heno empacado, o ensilado. La fuente de toxina, generalmente es de cadáveres de pequeños mamíferos, aves o gatos que han muerto accidentalmente y se han incorporado al ensilado durante su preparación.

En Francia se comprobó que más de la mitad de los casos estaba relacionada con la presencia de cadáveres de gatos en el alimento (Prévot y col., 1955).

La toxina difunde rápidamente por las zonas de heno o ensilado que rodean al cadáver, el heno en estas condiciones puede ser tóxico durante un período de hasta 22 meses (Smith, 1980).

Esta forma de Botulismo se produce cuando el pH, la humedad y las condiciones anaerobias en el pienso permiten el crecimiento vegetativo del *Clostridium botulinum* y la producción de sus toxinas. Esto puede ocurrir en diversos forrajes almacenados descompuestos, el ensilaje de cereales es un factor de riesgo en los EE.UU. Existe una mayor probabilidad de que las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo se presenten cuando los granos son más succulentos y presentan mayor humedad.

El período de incubación en el vacuno, es de dos a siete días, lo que dificulta determinar que parte del heno o ensilado es la toxica, probablemente cuando se diagnostica la enfermedad, todo el alimento ya ha sido consumido. Se describen casos sobreagudos en los que el curso de la enfermedad es muy rápido, y los animales presentan parálisis en pocas horas (Müller, 1963).

6.3. Botulismo asociado a carroña

Es causa frecuente de Botulismo en los animales que se alimentan de piensos conservados. Las carroñas comprenden los animales domésticos y silvestres, incluyendo las aves. En las áreas endémicas de Botulismo, los cadáveres de los animales son invadidos por *Clostridium botulinum* y se producen concentraciones elevadas de toxina, de manera que una cantidad muy pequeña de carne o de hueso presenta cantidades letales. Una fuente habitual en Australia es el heno que se prepara cuando existe una plaga de ratones en los cultivos.

El estiércol y la cama de ave ensilada, han producido brotes de Botulismo cuando se han empleado como alimento para el ganado vacuno, así como también en zonas que se usa para fertilizar (Radostits y col., 2002).

Se producen brotes ocasionales debido al consumo de agua contaminada con cadáveres de animales de aves acuáticas que hayan muerto por Botulismo.

6.4. Botulismo de las heridas

Si bien esta no es la forma de presentación más común de la enfermedad, se han descrito en potrillos, aves y niños casos de toxiinfección debido a la proliferación de *Clostridium botulinum* tanto en intestino como en heridas generando toxinas que al absorberse producen la enfermedad (Bermúdez y col., 1991).

Es raro el crecimiento del microorganismo y la producción de la toxina en heridas. Cuando las heridas se necrosan, proporciona un medio anaerobio que permite el crecimiento vegetativo de las esporas de *Clostridium botulinum*, y la absorción subsiguiente de la toxina hacia el torrente sanguíneo (Rebhun, 1999).

En caballos, se ha descrito después de una castración, onfaloflebitis, y asociado a heridas infectadas, y con abscesos causados por inyectables (Radostits y col., 2002).

6.5. Botulismo visceral

En el bovino es posible un Botulismo como ocurre en el hombre y en el potrillo, donde la patogenia se basa, en la absorción de pequeñas cantidades de la toxina botulínica, de larga duración, que puede interferir con el control neurológico de la fisiología intestinal. Existen informes de una enfermedad bovina hasta ahora desconocido en Alemania, donde se realizaron bioensayos para *Clostridium botulinum*, sus esporas y toxinas en animales de granjas, revelaron la presencia de toxina botulínica libre en los contenidos de las secciones del intestino. Supone el crecimiento vegetativo de las esporas en una región anaerobia o necrótica del tracto gastrointestinal (Rebhun, 1999). Los autores denominan a ésta compleja enfermedad "Botulismo visceral" (Rebhun, 1999; Böhnelt y col., 2001).

En equinos, este tipo ocurre cuando la toxina es producida por el *Clostridium botulinum* en el intestino, se denomina también " Síndrome del potro temblón" y se trata de un trastorno que afecta a animales de hasta 8 meses de edad, con mayor prevalencia entre 3 y 8 semanas, se produce esporádicamente en EE.UU., Reino Unido, y Australia (Radostits y col., 2002).

6.6. Factores de riesgo

- Categorías con mayores requerimientos son más susceptibles, como es el caso de vacas gestantes y con ternero al pie.
- La bibliografía hace referencia a cierta susceptibilidad de las razas cebuinas y sus cruzas.
- Tienen una distribución estacional.
- Es más probable que aparezcan brotes en períodos de sequía, cuando la comida es escasa, y la carroña es abundante.
- Ensilaje de desechos avícolas como alimento para bovinos.
- Fertilizar con desperdicios avícolas praderas destinadas a alimentar bovinos.

- Cama de aves utilizada como cama para bovinos.
- Mala calidad de los fardos ensilados o contaminados con cadáveres de roedores.
- Mala higiene de los comederos.
- Roedores muertos en praderas.
- Deficiencia de fósforo y/o deficiencia alimenticia que aumenta las posibilidades de consumo de carroña.
- Agua contaminada con cadáveres y utilizada para bebederos (Jones, 2000).

7. PATOGENIA

El Botulismo es producido por la ingestión de toxinas de *Clostridium botulinum*, que en determinadas condiciones producen potentes neurotóxicas, las que difieren antigénicamente entre sí. Se producen durante la fase de crecimiento de la célula vegetativa y se libera cuando la bacteria se lisa. La activación tiene lugar cuando la cadena polipeptídica se rompe en dos fragmentos debida a la acción de proteasas endógenas o exógenas, como la tripsina, dando como resultado dos moléculas de tamaño desigual una pesada y otra ligera (Markey y col., 2013).

La toxina botulínica es absorbida en su mayor parte en la pared de la porción superior del intestino delgado (Zurbruggen y col., 1985). Una vez en el torrente sanguíneo, llega a las células de los nervios periféricos, donde actúa en las uniones neuromusculares de los nervios colinérgicos y también en las sinápsis autonómicas periféricas (Markey y col., 2013).

La toxina principal es una proteína que forma complejos con proteínas botulínicas no tóxicas, para producir un complejo botulínico bioactivo. Dicho complejo se fija a la membrana pre sináptica que hay en los extremos de las neuronas motrices en la unión neuromuscular (Madigan y col., 2004).

Mientras la toxina se encuentre fuera de la célula, se puede neutralizar de manera específica con antisuero apropiado, pero es imposible hacerlo una vez que la toxina se encuentra dentro de la célula (Cerrato y Valle, 2002; Forero, 2007).

Las cadenas pesadas se unen a células susceptibles permitiendo la entrada de la toxina por endocitosis. Una vez en el citosol, actúa sobre la proteína sinaptobrevina (proteína integral de membrana de la vesícula sináptica) y otras proteínas, degradándolas de forma selectiva, impidiendo así la exocitosis y la liberación del neurotransmisor acetilcolina en las uniones neuromusculares, como se observa en la figura 4 (Markey y col., 2013).

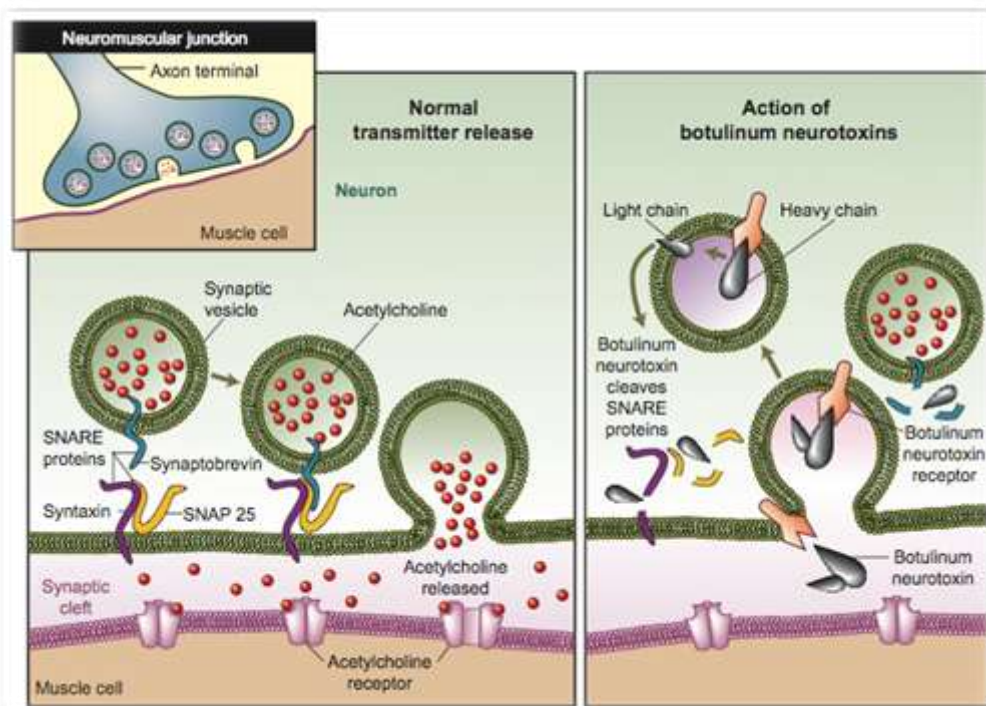
La transmisión del impulso nervioso al músculo, requiere la interacción de acetilcolina con un receptor muscular, la toxina impide que el músculo reciba el estímulo, como consecuencia, los músculos no se contraen en respuesta a la actividad de las neuronas motoras, ocurriendo una parálisis muscular flácida bilateral que interfiere con la respiración y conduce en último término a la

muerte por asfixia (figura 5) (Freeman, 1986; Willey y col., 2011; Markey y col., 2013).

El modo de acción de la neurotoxina a nivel molecular no se ha determinado completamente, pero parece que tiene lugar en tres etapas: fijación sobre un receptor de membrana, translocación, y etapa intracelular (Cerrato y Valle, 2002).

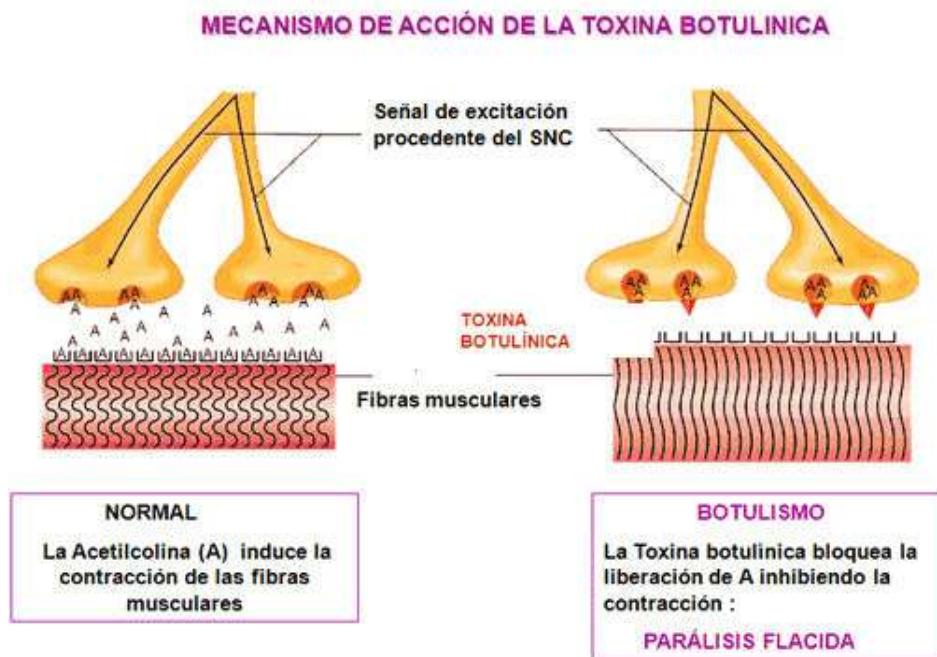
El curso clínico del padecimiento es afebril y depende del tipo y cantidad de toxina botulínica ingerida. Al cabo de un período de incubación de pocas horas hasta 1 a 2 días se ocasionan los primeros síntomas de la enfermedad (Jones, 2000; Radostits y col., 2002).

Figura 4. Mecanismo de acción de la toxina botulínica.



Fuente: Seminario de Patogenicidad bacteriana, Universidad de Buenos Aires Facultad de Medicina. Disponible en: http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/2013/Seminario_3.pdf

Figura 5. Bloqueo de la liberación de acetilcolina.



Fuente: Biología de los Microorganismos, Madigan y col, 2004.

8. PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN BOVINOS

8.1. Evolución del cuadro clínico

La presentación y la evolución de la enfermedad van a depender de la cantidad de toxina ingerida (Riet-Corre y Gevehr, 2002), pudiendo presentarse casos hiperagudos, el cual evoluciona en menos de 24 horas donde solo se constata en etapas finales y en forma muy fugaz. Los casos fulminantes mueren sin signos previos de enfermedad, aunque algunos rechazan comer o beber un día antes. La mayoría de los animales cursan con cuadro agudo de uno a dos días, no hay un estado febril marcado, apenas un cuadro clínico de parálisis muscular progresivo en los miembros, mandíbula, resto del cuello y cabeza (Melling y Alder, 2000). Sin embargo la evolución de la noxa puede ser de uno a diecisiete días luego de que los animales hayan tenido acceso al material tóxico, existiendo casos subagudos (tres a siete días), o crónicos (siete días a un mes), en la que los animales afectados tienen mayores posibilidades de supervivencia (Riet-Correa y Gevehr., 2002; Braun y col., 2005).

Se han citado casos raros de curaciones espontáneas de esta enfermedad la cual se presenta al cabo de dos a tres semanas (Hederich y col., 1976).

8.2. Síntomas clínicos

El Botulismo se caracteriza por parálisis muscular progresiva simétrica y flácida, que afecta particularmente los músculos de las extremidades, mandíbula, lengua y faringe. La debilidad y la parálisis muscular comienzan en los miembros posteriores avanzando hacia los anteriores, cabeza y cuello. Al inicio presentan temblores y fasciculaciones, a menudo suficientes para que

toda la extremidad tiemble. El animal cae en decúbito esternal, luego costal, y la muerte se produce por fallo respiratorio.

A modo de un mejor entendimiento de la sintomatología clínica que se presenta en esta enfermedad, las clasificaremos en tres períodos. Pero cabe destacar que no existe un orden claro en la aparición de los síntomas, pudiendo presentarse casos de muerte súbita sin sintomatología aparente.

8.2.1. Primer período

Transcurridas veinticuatro a cuarenta y ocho horas, los animales están rezagados separándose del rodeo. Se presenta disminución de la producción láctea. Los que todavía pueden mantenerse en pie pueden mostrar temblores musculares, leve intranquilidad como “zapateo”, movimientos laterales con los miembros posteriores más abiertos de lo normal, como en la micción pero sin orinar. Masticación sin fuerza, bebiendo de pequeños tragos, deglución dudosa o imposible, reflujo por boca y nariz.

Se observa disminución del tono de la musculatura de los miembros, parálisis flácida, incoordinación del tren posterior, evolucionando a miembros anteriores, cabeza y cuello.

Se observa, debilidad y dificultad en la locomoción, con marcha tambaleante y rígida. El animal trata de mantener el equilibrio, pero se acentúa la pérdida de fuerza de sus miembros posteriores y termina por caer, y luego de varios intentos por mantenerse en pie, adopta una postura de decúbito estremo-abdominal con la cabeza apoyada en el flanco o en el suelo. En este primer período, los reflejos se presentan normales.

No levanta la cabeza. Las orejas, parpados y labio superior se encuentran notablemente flácido, así como la lengua que se saca de la boca con facilidad, debido a que la mandíbula se encuentra flácida. En algunos casos la lengua se paraliza y cuelga de la boca, siendo este un signo específico y sensible para el botulismo en el ganado, en consecuencia el animal es incapaz de masticar o deglutir, presentando sialorrea, adipsia y anorexia. La cola permanece flácida con parte media y distal separadas del cuerpo (Leaniz y Pasini, 1987; Radostits y col., 2002; Dirsken y col., 2005).

8.2.2. Segundo período

A partir de las cuarenta y ocho a setenta y dos horas, el animal hace esfuerzos con los miembros anteriores para levantarse, se observa excitación y trata de embestir. En general la coordinación es dificultosa, permanece en posición de perro sentado con cabeza gacha, el vientre péndula lateralmente, cola colgante. Raramente ocurre anomalía en la función sensorial, mantiene la sensibilidad cutánea, paravertebral y en los miembros. La pérdida de sensibilidad puede estar asociada a decúbito prolongado a consecuencia de lesión muscular isquémica. Mantiene respuesta positiva a los reflejos laríngeos, pupilares y anales, pero los movimientos ruminales pueden estar normales o disminuidos. Al principio el animal defeca y orina normalmente. Posteriormente la materia fecal se endurece y presenta dificultad para orinar, en los casos hiperagudos se puede percibir diarrea. El animal en sus intentos por

incorporarse se debilita cada vez más, presentando flexión lateral de la cabeza y cuello, terminando en posición decúbito costal (figura 6 y 7) (Leaniz y Pasini, 1987).

8.2.3. Tercer período

En este período el animal toma una posición de decúbito costal, observándose pérdida progresiva de los reflejos, deja de comer y beber y finaliza en un estado de indiferencia, comatoso que lleva a la muerte (Leaniz y Pasini, 1987). En la faringe suele encontrarse un “ovillo” de alimento, éste o el paladar blando, pueden causar un estridor roncante (Dirksen y col., 2005).

Puede presentar parálisis ruminal e intestinal, constipación, anuria, deshidratación que como consecuencia presentara enoftalmia y pérdida en la turgencia de la piel, membranas mucosas secas y midriasis. Disminución o cese de la micción, por estancamiento de orina a consecuencia de vejiga paralizada. La cola en este estadio no presenta movimiento activo, quedando en el mismo lugar que la desplaza el examinador.

La parálisis de los músculos del tórax produce una respiración terminal del tipo abdominal, con bradicardia y disnea.

A consecuencia de un decúbito prolongado, es posible reconocer la inspiración bifásica que se considera patognomónica. Se distingue una primera fase de dilatación de la caja torácica con flancos hundidos y una segunda fase con protrusión de los flancos por contracción brusca del diafragma (Dirksen y col., 2005).

Los animales pueden permanecer enfermos por varios días, hasta quedar en posición de decúbito y luego morir. La muerte por Botulismo se debe generalmente a un fallo respiratorio provocado por parálisis muscular flácida (Madigan y col., 2004).

En aquellos animales que logran recuperarse de la enfermedad, se han observado “rugidos” sonidos respiratorios que persisten durante tres meses (Jones, 1991).

No existe evidencia de la ocurrencia de abortos en ninguno de los períodos antes mencionados. Las complicaciones más frecuentes son las neumonías, miasis, escaras por decúbito, heridas por aves de rapiña y deshidratación en verano (Leaniz y Pasini, 1987).

Figura 6. Sintomatología concurrente con Botulismo.

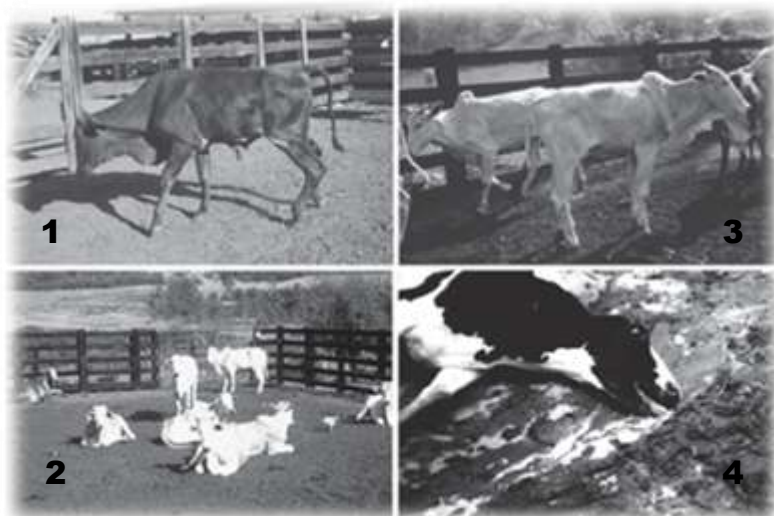


Figura 1: dificultad en la locomoción y flexión de los miembros bovino con intoxicación crónica por la ingestión de cama de ave y que sobrevivió a intoxicación botulínica (Araraquara, SP). **Figura 2:** bovino afectado por Botulismo por consumo de cama de ave contaminada, con dificultad locomotora (Araraquara, SP). **Figura 3:** animales con manifestaciones clínicas de diferentes intensidades de intoxicación botulínica, en decúbito y con estado mental aparentemente normal (Araraquara, SP). **Figura 4:** Vaca Holando con dificultad respiratoria, sialorrea en concurrencia con intoxicación botulínica aguda por ingestión de cama de ve contaminada (São José do Rio Preto, SP).

Fuente: Dutra, I. S. y col. (2005) Botulism in beef and dairy cattle fed with poultry litter. Pesquisa Veterinária Brasileira. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2005000200009

Figura 6. Bovino con parálisis del tren posterior.



Fuente: Bovino acometido por Botulismo com dificuldade em se levantar. Disponible en: <http://marcosveterinario.blogspot.com.uy/2009/04/Botulismo-em-bovinos-no-brasil.html>

9. PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN OTRAS ESPECIES

9.1. Equinos

No se ha descrito en la literatura casos de *Clostridium botulinum* en equinos en el Uruguay, sin embargo se han reportado varios informes de esta enfermedad en Europa durante la última década (Wollanke, 2004; Gerber y col., 2006).

Se han observado en los caballos tres formas de Botulismo que causan la patología, Botulismo toxicoinfeccioso (síndrome de agitación del potro), envenenamiento del forraje y Botulismo de las heridas. De los siete serogrupos de *Clostridium botulinum*, los A, B, C y D causan la enfermedad en los equinos, siendo los tipos B y C responsables de la mayoría de los casos (Wollanke, 2002; Smith, 2010).

La enfermedad es poco frecuente, la intoxicación se debe en la mayoría de los casos a la ingestión accidental de pienso contaminado con la toxina, a través de pequeños roedores u otros animales portadores (Leaniz y Pasini, 1987).

En esta especie el cuadro clínico se caracteriza por debilidad que avanza hacia parálisis, incapacidad para deglutir y con frecuencia la muerte. Siendo su presentación más frecuente la forma subaguda (Smith, 2010).

El cuadro clínico inicial esta dado por midriasis y ptosis, pudiendo presentar cólico. Posteriormente presenta signos de inquietud, incoordinación, marcha insegura, apoyo de los miembros anteriores con la cuartilla y ataxia, seguidos de la incapacidad para levantar la cabeza. Se conserva la sensibilidad cutánea, los animales afectados permanecen en decúbito esternal, con la cabeza en posición de auto auscultación. La lengua se paraliza y cuelga de la boca. El animal no es capaz de masticar ni deglutir y sialorrea (Figura 8).

En potros el temblor muscular es a menudo un signo inicial prominente. La marcha es rígida y envarada arrastrando los cascos. Si el potro mama la leche cae de la boca y si intenta comer heno regurgita parte del material por la nariz. Siempre existe estreñimiento, y se produce una progresión rápida hacia un estado de debilidad muscular y postración, permaneciendo despiertos y alertas. La muerte se produce alrededor de las setenta y dos horas posteriores a la aparición de los signos, debido a una insuficiencia respiratoria (Radostits y col., 2002).

Figura 7. Equino con parálisis lingual por Botulismo.



Fuente: Figueroa, M. (1984). Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica.

9.2. Ovinos

El Botulismo de esta especie solo se ha diagnosticado en Australia y África del Sur (Bennetts, 1928; Bekker y Rossouw, 1930). Cualquiera que sea el origen de la pica de la oveja, el ingerir restos de pequeños animales suele ser la causa de la intoxicación botulínica y suele deberse al tipo C.

El período de incubación varía de doce horas a varios días, y este depende de la cantidad de toxina ingerida. Los primeros síntomas son marcha dificultosa e incapacidad de seguir al rebaño, las ovejas no presentan la parálisis flácida típica de otras especies, hasta el final de la enfermedad. Es frecuente la presencia de debilidad en el cuello antes que en las extremidades, el movimiento lateral de la cola, la salivación y la secreción nasal serosa (Smith, 1980; Radostits y col., 2002).

En la fase terminal, el animal presenta respiración abdominal, parálisis de las extremidades y la muerte sobreviene rápidamente (Radostits y col., 2002).

9.3. Aves

El Botulismo produce gran mortalidad tanto en aves terrestres, como acuáticas, encontrándose presente en la mayoría de los países del mundo. Los síntomas más característicos son parálisis flácida afectando principalmente los músculos de las alas (Cattáneo y col., 2009).

En Uruguay esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1948 por el Dr. Trenchi y sus colaboradores en patos (Trenchi y col., 1948).

Los brotes de mortalidad en las aves debido a Botulismo son usualmente causados por la toxina tipo C. Las aves usualmente se ahogan o mueren por falla respiratoria (Figura 9) (Olate y col., 2008).

Las aves afectadas muestran signos de debilidad, paresia y parálisis flácida progresiva de alas, cuello y patas. La incapacidad para sostener el vuelo es un indicio precoz de Botulismo. La cornea puede estar o no cubierta por la membrana nictitante que se encuentra paralizada, presentándose conjuntivitis. Hay una falta total del apetito originada posiblemente por la incapacidad de deglutir (Smith, 1980; Olate y col., 2008; Cattáneo y col., 2009).

Figura 8. Muerte de ave por Botulismo.



Fuente: Un nuevo brote de Botulismo provoca la muerte de aves. Disponible en:

http://www.lanzadigital.com/news/show/actualidad/un_nuevo_brote_de_Botulismo_provoca_la_muerte_de_aves/25221/

9.3. Caninos

Aunque es poco frecuente el Botulismo en caninos, ha sido descrito por varios investigadores (Müller y Thomsen, 1968). Son sensibles a las toxinas de los tipos A, B y E. El tipo C es el principal responsable del Botulismo en esta especie (Colbachini y col., 1999; Bruchim y col., 2006).

En el año 1992 fue diagnosticado por Bermúdez y Carrerto el primer caso de Botulismo tipo C en caninos, en el Uruguay (Figura 10) (Cattáneo y col., 2016). El Botulismo en perros se caracteriza por andar rígido, pasos cortos y muestran una clara incoordinación muscular. Rechazan el alimento y el agua, como consecuencia de la parálisis de la musculatura del esófago. Algunos presentan sialorrea y exceso de lagrimeo, en cambio en otros casos la secreción salival puede cesar y la mucosa bucal aparece congestiva y seca. En estos casos se origina el cese del lagrimeo con una consecuente conjuntivitis.

Dada la falta de evidencia diagnóstica de casos de esta enfermedad en perros, se desconoce el índice de mortalidad, aunque parece ser baja (Smith, 1980).

Figura 9. Canino con sintomatología de Botulismo.



Fuente: Cattáneo y Bermúdez, 1992. Disponible en: http://www.santaelena.com.uy/uc_86_1.html

9.4. Cerdos

Los cerdos tienen una resistencia congénita relativamente alta a todos los tipos de toxinas, salvo la B, pero incluso la misma se absorbe deficientemente a través de intestino.

Se han descrito brotes en EE.UU. debido al tipo B, y en Senegal y Australia por el tipo C (Beiers y Simmons, 1967; Doutre, 1967).

El período de incubación en el cerdo es de uno a tres días, siendo los primeros síntomas debilidad de los miembros posteriores y de la región lumbar. Los animales presentan pupilas dilatadas, dejan de beber y comer, marcha tambaleante seguida de postración en decúbito que progresa hacia la parálisis muscular flácida y posterior muerte (Smith, 1980; Radosits y col., 2002).

10. DIAGNÓSTICO

Debemos recordar que los *Clostridios* son bacterias difíciles de cultivar, por su condición de anaerobias. Por ello debemos valernos de todos los medios técnicos que estén a nuestro alcance para intentar llegar a un diagnóstico correcto.

El diagnóstico de Botulismo se realiza en base a la anamnesis, los síntomas clínicos y la demostración de la presencia de la toxina botulínica (Riet- Correa y Gevehr, 2002; Cattáneo y Bermúdez, 2006).

10.1. Muestras a remitir

Con el fin de confirmar el agente etiológico que está involucrado en la enfermedad, se debe realizar una toma de muestras que se recolecta inmediatamente después de la muerte del animal, ya que la invasión post mortem del microorganismo dificulta los análisis de laboratorio. El objetivo principal de la conservación de las muestras para el estudio microbiológico, es inhibir la multiplicación de gérmenes durante el envío, evitando dañar la flora presente cuando se realiza la toma de la misma (Popoff y Bouvet, 2009).

Las muestras a recolectar son suero sanguíneo (refrigerado o congelado), contenido ruminal, redcilla (retículo), librillo (omaso) e intestinal (refrigerado o congelado), bazo (refrigerado o congelado), fragmentos de hígado (refrigerado o congelado), vómitos en caso de mascotas (refrigerado o congelado), mitad de cerebro congelado y la otra mitad en formol al 10 % (Tokarnia, 1970; Bermúdez y col., 1991; Böhnelt y col., 2001; Riet-Correa y Gevehr, 2002).

El suero debe sufrir una congelación profunda tan rápido como sea posible luego de la toma de muestras de sangre, con el fin de estabilizar cualquier toxina botulínica que se encuentre presente. El volumen mínimo de suero que se requiere para la prueba de SP (Seroprotección) en el ratón es de 1 ml. Como la prueba tiene que repetirse en algunas ocasiones, es conveniente obtener un volumen de 10 ml. No debe usarse anticoagulantes (Jones, 2000).

Muestras para confirmar el diagnóstico:

- Bacteriología: alimento sospechoso, hígado, además del suero de los animales clínicamente afectados (bioanálisis, cultivo anaerobio, ELISA).
- Histología: cerebro fijado en formaldehído para microscopía óptica (Radostits y col., 2002).

Para la exclusión de otras enfermedades se deben coleccionar además: fragmentos de cerebro conservados en glicerina tamponada, frotis de sangre, músculo desecado, trozos de metacarpo y fragmentos de cerebelo, bazo, pulmones, corazón y ganglios linfáticos fijados en formol al 10 % (Tokarnia y col., 1970).

Según cada caso, para la comprobación de la o las toxinas pueden utilizarse los restos de cadáveres, de las muestras de alimento sospechoso, del agua superficial usada como abrevadero o bebederos artificiales (Dirksen y col., 2005; Senturk y Cihan, 2007; da Costa y col., 2008).

10.2. Necropsia

El diagnóstico de las enfermedades debe orientarse a partir de datos epidemiológicos, clínicos, lesionales y confirmarse en la mayoría de los casos por técnicas de laboratorio. Desde este punto de vista, la necropsia es una herramienta muy importante, ya que nos permite a la vez observar las lesiones y obtener las muestras que enviaremos al laboratorio.

En el Botulismo no existen cambios específicos detectables en la necropsia, pudiéndose observar en el animal deshidratación intensa (Lisbôa y col., 1996; Dirksen y col., 2005). Los animales se encuentran en decúbito esternal o lateral permanentemente (Lisbôa y col., 1996). Puede ser constante la presencia de hiperemia generalizada con trombosis de algunos vasos y sin lesiones histológicas características (Leaniz y Calvo, 2003). Observándose hemorragias inespecíficas debajo del endocardio y epicardio, edema pulmonar, poco contenido ruminal seco, además de congestión del intestino. Los cambios macroscópicos aunque inespecíficos consisten en, hemorragias perivasculares en el cerebelo y cerebro, así como congestión en las meninges (sin embargo hay que examinar histológicamente el cerebro para eliminar otras enfermedades neurológicas) (Radostits y col., 2002; Dirksen y col., 2005).

Pumukcu (1954), citado por Smith en 1980 afirma que las hemorragias perivasculares observadas en necropsias realizadas en animales enfermos en un brote de Botulismo bovino en Turquía, se presentaban mayormente en la médula oblonga. Aunque la presencia en bovinos de alimento y/o material extraño en el cuajo (abomaso) y redcilla (retículo), así como la impacción del librillo (omaso), pueden ser indicativos de la enfermedad (Draghi, 2000; Radostits y col., 2002; Leaniz y Calvo, 2003; Dirksen y col., 2005; Bermúdez y col., 2014). Ortiz y Benavides en 2002 describen que además de la presencia de cuerpos extraños en el aparato digestivo, ocasionalmente se halló la vesícula biliar pletórica.

10.3. Diagnóstico presuntivo

En el campo, un diagnóstico tentativo del Botulismo se basa en la presencia de sintomatología neuromotora (parálisis motriz progresiva) y su relación con la conducta de osteofagia en praderas pobres en fósforo; o por otros tipos de evidencia epidemiológica como el hallar animales muertos en heno o silos (Ortiz y Benavides, 2002).

Las manifestaciones clínicas de los animales afectados, se caracterizan por presentarse rezagados del rebaño, posteriormente se observa rigidez de los miembros posteriores al caminar, intensificándose la dificultad locomotora con intentos fallidos para levantarse, permaneciendo en decúbito esternal, conservándose la sed, apetito y reflejos. Progresando dicho cuadro, para

permanecer en decúbito costal, atonía ruminal, parálisis deglutoria y lingual, disminución de los reflejos neuromusculares, temperatura corporal normal, coprostasia, deshidratación y muerte por falla respiratoria. No se verifican abortos (Zurbriggen y col., 1985).

10.4. Diagnóstico definitivo

La detección de *Clostridium botulinum* es imprescindible para establecer su distribución en la naturaleza y su presencia en los alimentos, heces y otras muestras clínicas (Kautter y col., 1968). La demostración de este microorganismo, por su capacidad de formar toxinas en cultivos mixtos, generalmente va seguida de su aislamiento. Este procedimiento normalmente requiere bastante tiempo (Smith, 1980).

Es difícil establecer un diagnóstico de Botulismo, salvo que se demuestre la presencia de la BoNT (Neurotoxina botulínica). No hay hallazgos específicos hematológicos o químicos en esta enfermedad. La electromiografía realizada en ganado con Botulismo mostró una respuesta drásticamente reducida durante las pruebas de estimulación nerviosa repetitiva, un resultado similar al encontrado en seres humanos con la enfermedad (Rings, 2004).

Para la detección de la toxina se toma como primera opción la seroneutralización en animales de laboratorio. Existen métodos alternativos, tales como el uso de pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) (Gregory y col., 1996) o pruebas de fijación del complemento, entre otras (Dutra y col., 1993). La presencia de *Clostridium botulinum* en el intestino tiene poca importancia, así como la ausencia de la toxina en el contenido intestinal ya que ésta pudo haberse absorbido (Cattáneo y Bermúdez, 2006).

10.4.1. Siembra y aislamiento

El diagnóstico requiere una gama de medios que aseguren un crecimiento aceptable y la producción de toxinas en cuantía suficiente para poder hacer las tipificaciones necesarias. El éxito depende principalmente de la forma en que sean utilizados los medios, de alcanzar un ambiente anaerobio y reductor adecuado. Para la recuperación de bacterias del género *Clostridium* a partir de muestras clínicas se pueden utilizar medios de cultivo nutritivos sólidos con el agregado de sangre. Es recomendable la inclusión de un medio con yema de huevo para indagar la producción de lipasa y lecitinasa, y un medio líquido de enriquecimiento, como el Cooked meat. La temperatura de incubación es de 37° C, en anaerobiosis (Popoff y Bouvet, 2009).

La demostración de *Clostridium botulinum* mediante la identificación de su toxina en cultivos mixtos y su aislamiento no es tan sencillo. Esto se debe a que no se dispone de un procedimiento simple o un medio apto para todas las cepas del microorganismo. Muchos han sido los medios utilizados para el enriquecimiento y la detección de toxinas, el caldo de infusión de carne parece ser el mejor (Smith, 1980).

Smith cita a Segner y colaboradores, 1971, utilizaron un medio comercial de huevo y carne, al que adicionaron un 1 %de cada uno de los siguientes

componentes: glucosa, sulfato amónico y extracto de levadura. Este medio no solo resultó útil para la formación de esporas de las cepas de toxinas tipo C alfa, también sirvió como medio de enriquecimiento activo para las mismas, los pases seriados aumentaron el número relativo de bacterias de *Clostridium botulinum* tipo C (Smith, 1980).

Son variados los medios de enriquecimiento utilizados para el cultivo de los diferentes tipos de *Clostridium botulinum*, Van Ermengen citado por Kautter, 1968 (Kautter y col., 1968) realizó observaciones donde este microorganismo creció y produjo toxinas en caldo de infusión carne de doble potencial suplementado con peptona, cloruro de sodio y glucosa. En general los medios de enriquecimiento más comunes para todas las variantes de las diferentes cepas son infusiones de carne o hígado cocido (Kautter y col., 1968).

Luego de ser demostrada la presencia de *Clostridium botulinum* en un medio de cultivo en el que se ha puesto de manifiesto su toxina, la fase siguiente es el aislamiento en cultivos puros. Generalmente en esta fase se conoce el tipo de bacteria y las precauciones de anaerobiosis que deben tomarse pueden modificarse ligeramente si es que se trata de aislar cierta cepa. Todas las cepas que posiblemente pertenezcan a *Clostridium botulinum* deben evidenciar la producción de toxina, puesto que ello constituye una fase esencial para la identificación de esta especie (Smith, 1980).

10.4.2. Pruebas bioquímicas

El diagnóstico se basa en el cuadro clínico, el hallazgo de un cadáver, o el relato anamnésico sobre la presencia de la enfermedad (Radostits y col., 2002; Dirksen y col., 2005; Uzal 2013). El diagnóstico de laboratorio de Botulismo en el animal vivo o muerto es difícil debido a la falta de existencia de una prueba sensible, sumado a esto la baja dosis de toxina necesaria para producir toxicosis en los animales susceptibles (Rebhun, 1999).

No se observan cambios en los valores hematológicos ni bioquímicos que sean específicos del Botulismo. La alteración visible que puede ser un factor de riesgo para la presencia del Botulismo es la hipofosfatemia, también la actividad de las enzimas musculares, que puede estar moderadamente elevada (Radostits y col., 2002).

La confirmación del diagnóstico se realiza mediante: la detección de la toxina preformada en el suero, el contenido intestinal o el alimento. También la demostración de esporas de *Clostridium botulinum* en el alimento o el contenido gastrointestinal. La detección de anticuerpos en los animales recuperados o clínicamente sanos en situación de riesgo (Radostits y col., 2002).

10.4.3. Histopatología

Las alteraciones microscópicas observadas en hígado, pueden consistir en focos de necrosis coagulativa periacinar con infiltrado compuesto por linfocitos y algunos neutrófilos, e hiperplasia de las células de Kupffer. En ganglios linfáticos y bazo, se observa hiperplasia linfoidea. Hiperemia e infiltrado linfocitario de abomaso e intestino delgado. En cerebro se puede observar

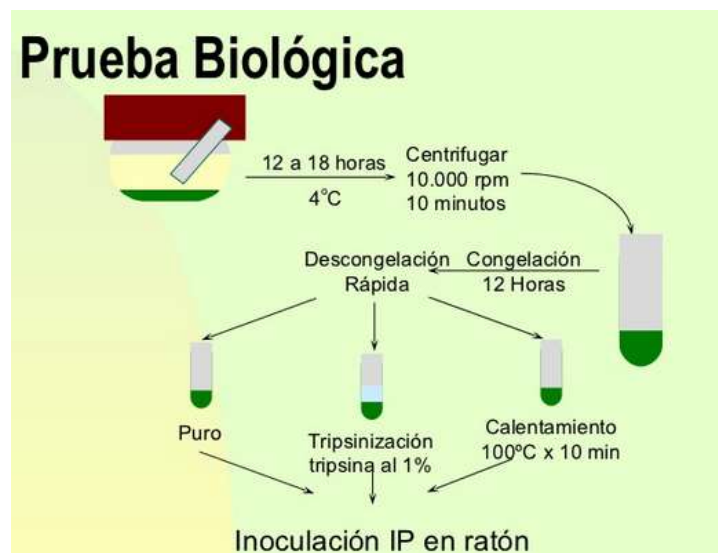
hemorragia perivascular, gliosis moderada, degeneración de neuronas y neuronofagia (Zurbriggen y col., 1985).

El examen histopatológico del sistema nervioso central puede revelar Petequias inespecíficas y congestión vascular. La histopatología de las terminaciones nerviosas, no se considera practicable en la confirmación de rutina del diagnóstico (Jones, 1991).

10.4.4. Bioanálisis

Dada la diversidad de toxinas botulínicas existentes en la naturaleza, la confirmación diagnóstica debe ir dirigida a determinar el (los) tipo (s) de toxina actuantes en el campo. El método aceptado por la comunidad científica es la prueba de seroneutralización en ratón utilizando anti-toxinas de referencia (figura 11) (Hatheway, 1988).

Figura 10. Prueba biológica.



Fuente: Ortiz y Benavides, 2015. Disponible en: <http://m.exam-10.com/biolog/28085/index.html>

La prueba se realiza inoculando ratones adultos (25 - 40 g) con volúmenes de 0,20 a 0,25 ml por vía intraperitoneal, de extractos de suero, leche, íleon, yeyuno, ciego, bazo y cerebro de los animales afectados o cultivo de alimentos filtrados (Kautter y col., 1968; Leaniez y Calvo, 2003). Las muestras deben ser procesadas antes de la inoculación.

Luego de la inoculación, la cual es recomendable realizar en horas de la mañana, se observan la presentación de síntomas hasta por 96 horas. Los signos característicos de Botulismo en ratones son: debilidad pronunciada en los cuartos traseros, acompañada de bajo tono de los músculos abdominales con presencia de un signo denominado abdomen de avispa o encintado (figura12) dificultad respiratoria y finalmente la muerte ocurre entre 24 y 48 horas posteriores a la inoculación experimental (Hatheway, 1988).

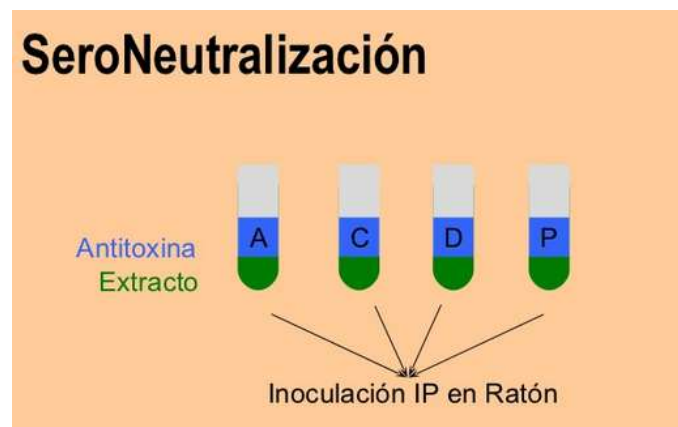
Figura 11. Prueba biológica de la actividad de toxinas botulínicas. Ratones con sintomatología compatible con Botulismo a la derecha, a la izquierda ratón control.



Fuente: Benavides, 2009. Disponible en: <http://es.slideshare.net/EVBenavides/muerte-sbita-bovina>

El diagnóstico se confirma mediante seroneutralización cuando la toxicidad del extracto es inhibida por una antitoxina específica (figura 13) (Rings M., 2004).

Figura 12. Seroneutralización para diagnóstico de Botulismo.



Fuente: Ortiz y Benavides, 2015. Disponible en: <http://es.slideshare.net/EVBenavides/muerte-sbita-bovina>

La sensibilidad de esta prueba parece ser baja en rumiantes y equinos. En brotes de Botulismo en bovinos no es infrecuente que solo una proporción o ninguno de los animales clínicamente afectados tengan un resultado positivo (Radostits y col., 2002; Heider y col., 2011). Sin embargo parece ser una prueba bastante sensible en perros, cerdos y aves (Bermúdez, 2016).

Otra alternativa es ofrecerles pienso sospechoso a animales de experimentación. Se utilizan infusiones con muestras de alimento o se ofrece en agua de bebidas. La incapacidad para producir la enfermedad en animales vacunados contra la enfermedad, cuando la muerte se ha producido en

animales control no vacunados, se ha utilizado también como método diagnóstico. Se debe tener en cuenta que todos los experimentos realizados con muestras de alimentos en que la toxina botulínica no se encuentra uniformemente distribuida en el pienso puede ofrecer resultados erróneos (Radostits y col., 2002).

La demostración de esporas de *Clostridium botulinum* en el alimento o en las heces de los animales afectados confirma el diagnóstico de Botulismo, pues las esporas botulínicas raramente se detectan en heces de animales sanos (Radostits y col., 2002).

En un brote ocurrido en Israel que implicó la muerte de 800 bovinos, el diagnóstico solamente se confirma cuando el alimento sospechoso se le suministró a los terneros vacunados y no vacunados y estos últimos sucumbieron (Jones, 1991).

Alimento sospechoso puede tener que ser suministrado a los animales susceptibles durante varias semanas para confirmar el diagnóstico, ya que la toxina no se puede distribuir de manera uniforme en la muestra (Jones, 1991).

Los animales que se recuperan de Botulismo no tienen la antitoxina detectable en su suero y la confirmación del diagnóstico en un caso esporádico de Botulismo puede ser imposible (Jones, 1991).

Pruebas de protección de ratón se utilizan normalmente en el diagnóstico de los casos de Botulismo veterinarios en el Reino Unido. Sin embargo, el bioensayo en ratones sólo puede detectar la toxina biológicamente activa, y los ratones pueden mostrar resistencia a algunos tipos de toxina botulínica. La cantidad de toxina capaz de matar a un caballo cuando se le inyecta por vía intravenosa, no es necesariamente fatal cuando se administra por vía intraperitoneal de un ratón (Jones, 1991).

Una prueba biológica negativa no excluye la presencia de Botulismo, dado que se ha demostrado que la toxina no es detectable en los casos promedio de animales de granja (Radostits y col., 2002).

La prueba es bastante sensible, pero tiene varios inconvenientes, entre ellos, el gran número de animales de laboratorio requeridos, la tardanza para obtener los resultados y la probabilidad de muerte inespecífica de los ratones, debida a interferencia de otras sustancias que pueden ser letales o influenciar la neutralización de las toxinas; por lo anterior, la interpretación adecuada de resultados requiere de gran experiencia (Radostits y col., 2002).

10.4.5. Elisa indirecto

Las pruebas de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) están disponibles en diferentes partes del mundo, pero son de sensibilidad equívoca. La demostración de la toxina en la dieta o en los tejidos en el examen post mortem, o de *Clostridium botulinum* en el contenido intestinal, proporciona evidencia circunstancial de Botulismo (Jones, 1991).

La detección de anticuerpos por ELISA indirecto en los animales crónicamente enfermos y en los animales del lote en riesgo se podría emplear para confirmar el diagnóstico de Botulismo de los tipos C y D. Esta técnica se ha utilizado en situaciones en las que no hay casos clínicos agudos de la enfermedad, ni animales muertos recientemente para la detección de la toxina *post mortem*.

Los bovinos expuestos a cantidades subletales de toxina con una inmunogenicidad suficiente desarrollan una respuesta específica de anticuerpos. Un aumento de la prevalencia de los anticuerpos en un grupo afectado indica una exposición a la toxina (Radostits y col., 2002).

La sensibilidad de la prueba ELISA para la detección de toxina tipo C y D en comparación con la inoculación de ratones fue del 70 por ciento, una especificidad del 96 % y una precisión del 90 por ciento, de las muestras de los animales diagnosticados con Botulismo mediante los signos clínicos y la historia del rebaño. Sin embargo, tanto la inoculación del ratón como ELISA, no lograron detectar la toxina en muchos animales con un diagnóstico presuntivo de Botulismo. Algunas reacciones cruzadas se observaron con *Clostridium novyi* tipo A, pero no con otras especies clostridiales. ELISA no puede sustituir a la inoculación de ratón para el diagnóstico de Botulismo, es una prueba adicional útil (Thomas, 1991).

El nivel más bajo de toxicidad detectable por el ELISA descrito varió $0,2^{10}$ a 2^{10} MLD₅₀/ml con diferentes filtrados de cultivo de la cepa homóloga de tipo D (Thomas, 1991).

Es importante desarrollar y adoptar procedimientos *in vitro* para sustituir las pruebas diagnósticas que se realizan actualmente en animales de laboratorio porque no hay una alternativa adecuada. Mientras que el ELISA no es lo suficientemente sensible como para reemplazar la inoculación del ratón para el diagnóstico de Botulismo en los animales, puede detectar la toxina en algunas muestras con insuficiente toxina biológicamente activa para matar ratones. También es útil para el cribado de cultivos en caldo de la presencia de toxinas de *Clostridium botulinum*. Sin embargo, las pruebas de protección en ratones siguen siendo necesarias para distinguir si una toxina es predominantemente C o D (Thomas, 1991).

10.4.6. Microfijación del complemento

Una prueba muy sensible para detectar la posible presencia de toxina botulínica es la de Johnson y colaboradores, 1966, que implica la sensibilidad de los eritrocitos de oveja formalinizados con la antitoxina específica y su aglutinación al ponerse en contacto con la toxina. Mediante este método puede detectarse 2,3 DL (dosis letal) ratón de toxina tipo D. Este método fue modificado y perfeccionado por Sakaguchi y colaboradores en 1974, quienes purificaron los hematíes de carnero para evitar las reacciones cruzadas entre las toxina tipo A y B, de esta manera aumento la sensibilidad permitiendo detectar 89 DL50 de toxina tipo A y 10 a 59 DL50 de la toxina tipo B (Smith, 1980).

Esta prueba diagnóstica ha sido utilizada en aves y se estableció una sensibilidad de 40 veces más que el bioensayo en ratones. La prueba demostró tener una alta especificidad en la detección de la toxinas C y D del *Clostridium botulinum* (Dutra y col., 1993).

10.4.7. Inmunodifusión en gel de Agar

En un principio detectaba hasta 370 DL50 por ml de muestra de alimento, no podría emplearse cuando el material de ensayo era coloreado, lipídico o coloidal. Luego fue modificado logrando mayor rapidez, sensibilidad y detectando hasta 140 DL ratón por ml de toxina botulínica tipo A en 2 horas. Resultando eficaz no solamente para la detección de toxina en filtrados de cultivos (Kautter 1968; Smith 1980).

10.4.8. Radioinmunoensayo

Esta técnica es capaz de detectar 100 DL ratón para la toxina botulínica, que es además muy específica para cada tipo de toxina. La toxina muy purificada se convierte en radioactiva acoplándose al yodo radiactivo. La solución en la que debe detectarse la toxina se adiciona a una cantidad estándar de antitoxina, que se prepara frente a la toxina radioactiva y se calcula la cantidad de la misma que se une a la antitoxina, indica la presencia de toxina botulínica en la muestra problema (Boroff y Schun-Chen, 1973; Smith, 1980).

10.4.9. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de biología molecular que tiene como objetivo amplificar fracciones muy pequeñas de ADN específico y suministrar material suficiente para secuenciar o clonar el fragmento con precisión mediante técnicas estándar, con el fin de poder identificar con alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, detección de enfermedades genéticas, entre otras. Las pruebas son rápidas, sensibles y específicas (Prescott y col., 2000).

Pruebas recientes, como la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de segmentos de genes específicos de *Clostridium botulinum* está desarrollada para eliminar la necesidad de realizar pruebas en animales. PCR tiene la desventaja de poner en evidencia sólo las bacterias, no la toxina. La presencia de la bacteria no significa necesariamente que la enfermedad este presente, debido a que algunas cepas de *Clostridium botulinum* no producen neurotoxinas. Además, debido a que estas bacterias se pueden encontrar en las heces de los animales sanos, la detección de este organismo en las heces se debe considerar significativa sólo si los síntomas clínicos encajan dentro del cuadro de Botulismo (Rings M., 2004).

10.4.10. Técnica de inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es un proceso donde colorantes llamados fluorocromos se exponen a la luz UV (ultravioleta), violeta o azul, para provocar en ellos fluorescencia y que emitan una luz visible. Dichos fluorocromos se pueden unir a moléculas de anticuerpos sin alterar la capacidad del mismo de unirse a un antígeno específico (inmunofluorescencia indirecta), y también se pueden unir a antígenos, llamado inmunofluorescencia directa (Prescott y col., 2000).

Esta técnica fue empleada en el *Clostridium botulinum* en 1960 por investigadores rusos, comprobándose que la tinción con antisuero fluorescentes no siempre concordaba con la especificidad serológica de la toxina producida, dado que el suero fluorescente preparado frente a bacterias del tipo B también teñía a las del tipo A, pero no lo hacía con las del tipo C, D y E (Smith, 1980).

Se puede realizar aislamiento de intestino y órganos de los animales con *Clostridium botulinum*, también se detecta la presencia de dicha bacteria por intermedio de técnicas de inmunofluorescencia, pero todas ellas carecen de real significación, debido a que el germen citado puede ser hallado en animales afectados (Leaniz y Calvo, 2003).

El uso de técnicas de anticuerpos fluorescentes para el estudio de *Clostridium botulinum* ha dado una gran variedad de resultados. Teóricamente, las técnicas de anticuerpos fluorescentes ofrecen una serie de ventajas con respecto a métodos culturales de identificación de bacterias desconocidas. Ellos son rápidos, capaces de detectar pequeñas cantidades del organismo sospechoso, y pueden discriminar entre un gran número de otros contaminantes (Kautter y col., 1968).

La utilidad de los procedimientos de anticuerpos fluorescentes para el examen de los alimentos es limitada, debido a la pérdida por envejecimiento de la capacidad de las bacterias de reaccionar con los anticuerpos fluorescentes. En consecuencia el fallo en encontrar bacterias teñibles no prueba la ausencia, de la misma manera que el no poder poner de manifiesto la toxina no prueba que no existan formas vegetativas de *Clostridium botulinum* (Smith, 1980).

Esta técnica se considera específica para las células vegetativas de *Clostridium botulinum*, y podría ser útil en la identificación rápida de colonias tóxicas y en el estudio de pureza para cultivos (Aalvik y col., 1973).

Debemos recordar que la presencia de *Clostridium botulinum* en el aparato digestivo tiene poca importancia diagnóstica y el examen para detectar la toxina a menudo es engañoso, ya que existe la posibilidad de que la toxina ya se haya absorbido.

Posiblemente la presencia de toxina botulínica en el hígado durante el examen *post mortem*, se considera una prueba de que se ha producido la enfermedad (Radostits y col., 2002). Lo mismo ocurre con el alimento sospechoso, donde la toxina está distribuida en forma despareja y la parte contaminada ya pudo haber sido ingerida antes de extraer la muestra (Dirksen y col., 2005).

Es posible que el pienso se contamine durante la cosecha, y que a la hora de ofrecerlo a los animales este contaminado con toxinas de *Clostridium botulinum* sin la presencia de cadáveres en el mismo (Dirksen y col., 2005).

En casos avanzados la toxina puede estar unida a las neurofibrillas y causar la enfermedad sin ser detectada en el suero, por ello la falla en la demostración de la toxina, no descarta la posibilidad del Botulismo. Es así que en la mayoría

de los casos de Botulismo en el mundo no se logra la confirmación por detección serológica (Jones, 2000).

11. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

La categorización de la enfermedad de acuerdo con la etiología, edad y especie de los animales, además de los principales signos clínicos es probablemente el método de más ayuda para el profesional que se enfrenta a un diagnóstico diferencial (Barlow, 1989).

Se realiza un diagnóstico presuntivo teniendo en cuenta los signos clínicos y la historia, la presencia de la dolencia en los animales no vacunados y la exclusión de otras patologías con una presentación clínica similar. La parálisis motora simétrica del Botulismo con parálisis muscular que avanza a la postración de uno a cuatro días, es un signo diferencial importante de Botulismo, respecto a otras causas de disfunción nerviosa en grandes animales (tabla 5).

Tabla 5. Diagnóstico diferencial de Botulismo en rumiantes.

Enfermedades	Características diferenciales	Confirmación por laboratorio
Enfermedades infecciosas		
Absceso cerebral	Depresión/excitación variable, ceguera, convulsiones.	Bacteriología del cerebro. Macro e histopatología
Rabia (<i>Lyssavirus</i>)	Salivación, agresión o debilidad, muere de cuatro a seis días.	Sección del cerebro (técnica de anticuerpo fluorescente), histopatología, serología.
Tétano	Rigidez, timpanismo, prolapso del tercer parpado.	Bacteriología de la lesión. Prueba de seroneutralización en ratón.
Meningoencefalitis por Listeria	Unilateral, decaídos y pirexia.	Bacteriología e histopatología del cerebro.
Encefalitis espongiiforme bovina	En bovinos adultos, de comienzo insidioso, tremor, caídas	Histopatología de cerebro, de denuncia obligatoria.
Parálisis por garrapata	Debilidad, Parálisis motora ascendente y simétrica.	Exposición al parásito.
Encefalitis hepática del ternero (herpesvirus tipo 5)	Sialorrea, ceguera, fiebre, trastornos en la deglución.	Datos anamnésicos.
Enfermedad de Aujeszky	Prurito, bramidos, dar vueltas, convulsiones, pirexia.	Serología, histopatología del cerebro, examen macroscópico.
Fiebre catarral Maligna	Pirexia, disnea, descarga nasal y ocular	Histopatología (vasculitis).
Encefalomielitis esporádica bovina	En ganado joven, emaciación, nerviosismo, fiebre, hipersalivación.	Lesiones postmortem, histopatología (músculo, SNC), serología.
Enfermedades metabólicas		
Acetonemia	Posparto, no progresiva.	Betahidroxibutirato sérico.
Deficiencia de Magnesio	Convulsiones tetánicas.	Magnesio sérico.
Hipocalcemia de periparturientas	Asociada con el parto, se asemeja al Botulismo, depresión de los reflejos.	Estimación del calcio sérico.

Intoxicaciones

Hepatoencefalopatías (hierbas)	Acceso a plantas que contienen alcaloides pirrolizidínicos. Decaimiento/excitación variables, subaguda, diarrea, tenesmo.	Daño hepático y prueba de funcionamiento, histopatología del hígado.
Intoxicación por Ionóforos	Inapetencia, diarrea, temblores, debilidad, atonía ruminal.	Antecedentes de uso de estos promotores del crecimiento en el alimento.
Intoxicación por Plomo	Decaimiento, ceguera, anorexia, estasis ruminal, presión en la cabeza.	Estimación de de plomo en sangre, hígado y riñón
Intoxicación con Levamisol	Antecedentes de tratamientos recientes, lamido de labio, sacudida de la cabeza.	Levamisol en sangre.
Intoxicación con nitrato	Disnea, debilidad, colapso, oscurecimiento de la sangre.	Metahemoglobina, nitrito urinario y sérico.
Intoxicación con organofosforados	Disnea, colapso, diarrea, hiperestesia, salivación	Colinesterasa en sangre, análisis de tejido.
Ryegrass	Estacional, baja mortalidad, la marcha rígida.	Histología de músculo, cerebro.
Intoxicación por urea	Signos semejantes a hipomagnesemia.	Estimación de la urea sérica.
Intoxicación por mercurio	Antecedentes de acceso al mercurio (granos tratados), ceguera, presión en la cabeza.	Histopatología del cerebro, mercurio en hígado y riñón, sangre heparinizada.

Misceláneas

Necrosis cerebrocortical (poliencefalomalacia)	Ceguera, opistótonos, convulsiones, nistagmos.	Macro e histopatología del cerebro.
Síndrome de vaca caída	Asociado con el parto, generalmente esta alerta y se alimenta.	Parto 24 a 72 horas antes.
Neoplasia cerebral	Agresión, delirio, convulsiones (variable).	Macropatología de cerebro
Trauma	No progresiva, lesión externa.	Macropatología de cerebro y médula espinal.
Deficiencia de vitamina E/Selenio	En animales jóvenes, debilidad muscular.	Vitamina E/ selenio sérico, lesiones postmortem, histología del músculo.
Deficiencia de vitamina A	En animales jóvenes, síncope y convulsiones o ceguera.	Vitamina A en suero y/o hígado.
Deficiencia de vitamina B1 (poliencefalomalacia)	Buen desarrollo nutricional, ceguera, inapetencia, opistotono, decúbito.	Vitamina B1 en suero.

Fuente: Jones, T., (2000). Botulismo Bovino. Disponible en: Manual Para la Práctica Veterinaria: Practica bovina 2.

12. TRATAMIENTO

No hay tratamiento específico, es principalmente de sostén debido a que la toxina ya fijada a los receptores neuromusculares está unida de modo irreversible hasta que tenga lugar su deterioro natural (Rebhun, 1999).

Cuando el curso de la enfermedad se desarrolla rápidamente, se presume que se ingirió una gran cantidad de toxina y el pronóstico puede considerarse malo. En las formas clínicas subagudas puede intentarse tratamiento sintomático, con ciertas posibilidades de éxito, indicándose mantener la hidratación con soluciones hidroelectrolíticas, administrar antibióticos bacteriostáticos para prevenir infecciones secundarias, laxante (aceite mineral salinos en gran volumen mediante sonda gástrica) para eliminar la toxina del tubo digestivo, complejos minerales y vitamínicos (complejo B). En estos casos puede pretenderse el uso de sueros antitóxicos a altas dosis al comienzo del proceso, siempre de relativo valor. Vacunar el resto de los animales que pueden o pudieron haber tenido contacto con la fuente de infección, considerando que en este período de latencia de la vacuna, que dura de 2 a 3 semanas, otros casos pueden ocurrir. El suministro de agua y alimentos en los casos leves puede darle suficiente sobrevida como para revertir el cuadro (ingestión de poca toxina) (Leaniz y Calvo, 2003).

Se puede indicar la antitoxina como tratamiento inmediato para contrarrestar la toxina circulante, que aún no se ha unido a los receptores. Existen antitoxinas polivalente para *Clostridium botulinum* que han sido usadas en tratamiento de pacientes. Aunque indicadas indudablemente, es posible que las antitoxinas polivalentes no puedan adquirirse fácilmente, ya sea por su valor comercial, así como su falta de eficiencia, debido a que en muchos casos no se conoce el tipo exacto de toxina actuante, como sucede en EE.UU. donde es común brotes de Botulismo por toxina de tipo B. Si son accesibles y están indicadas en base a la probabilidad geográfica del tipo de toxina, se pueden utilizar como primer tratamiento (Rebhun, 1999).

Puede ser útil el uso de tetraetilamina, guanidina o 4-aminopirimidina, que estimula la liberación de acetilcolina a nivel de la unión neuromuscular (Cerrato y Valle, 2002). Se debe administrar por goteo intravenoso, de otra forma su efecto será transitorio. El monoacetato también puede ser de valor en la terapia, ya que actúa en la membrana postsináptica para aumentar la tensión muscular (Jones, 2000). Está contraindicado el uso de antibióticos como penicilina procaínica, tetraciclina y aminoglucósidos porque aumentan el bloqueo neuromuscular (Senturk y Cihan, 2007).

En individuos sospechosos de tener Botulismo con origen en heridas o Botulismo toxicoinfeccioso, están indicados penicilina cristalina, drenaje y aireación de las heridas, y terapia de mantenimiento (Rebhun, 1999).

13. INMUNOPROFILAXIS Y MÉTODOS DE CONTROL

La propagación de los Clostridios y la residencia en determinados tractos o aparatos de muchas especies de animales, implican que su erradicación sea prácticamente imposible. Se deben tomar en cuenta medidas de manejo y esquemas de inmunización activa, para prevenir las diversas enfermedades que producen tanto en animales como en el hombre. El empleo de vacunas combinadas se ha convertido en una práctica habitual en la producción animal. Éstas vacunas, debidamente elaboradas resultan en una herramienta sumamente importante y son recomendables justificando la inversión que su empleo representa (Carlóni, 2007). Las enfermedades Clostridiales causadas por estos microorganismos pueden ser prevenidas por inmunoprofilaxis, antisueros o combinación de ambos (Sterne y Batty, 1978).

El control y prevención del Botulismo deben ser abordados desde un enfoque integral, dado que la presencia de la enfermedad está asociada a deficiencias minerales, además se debe considerar, que dentro del concepto de inspección del rebaño, la presencia de un brote con alta mortalidad es evidencia de desequilibrios ecológicos en el predio o región, por lo que una solución a largo plazo debe considerar aspectos de manejo, nutrición, genética y de inmunidad de la población (Ortiz y Benavides, 2002).

El método más eficaz y económico para el control del Botulismo es la aplicación de vacunas específicas que contengan los toxoides (toxina inactivada) que corresponden a los tipos actuantes. En África del Sur se estima que se vacuna anualmente entre tres y cinco millones de bovinos, en Australia la vacunación sistemática es parte del esquema sanitario de rutina (Leaniz y Calvo, 2003).

El control mediante el uso de vacunas debe ser complementado con medidas que ayuden al control de la enfermedad como ser: quema de cadáveres, rotación de potreros, en suelos con deficiencia de fósforo corregir la misma mediante la administración de minerales por vía inyectable u oral (Leaniz y Calvo, 2003).

Eliminar en forma inocua todos los cadáveres. Controlar constantemente toda la cadena alimenticia como obtención, preparación (picadora, mixer), transporte (vehículo, cintas), almacenamiento y distribución para que no tengan contacto con fuentes de contaminación. Las praderas contaminadas con toxina botulínica recién deben usarse una temporada después de que fueron pastoreadas por animales satélite (Dirksen y col., 2005). La literatura hace referencia además a retirar los animales de los potreros problema como una de las primeras medidas de control a tener en cuenta.

No es recomendable alimentar a los bovinos con cama de aves ni emplearla como cama en sistemas de estabulación, ni fertilizar praderas que tienen como fin el pastoreo. No es aconsejable ofrecer a los bovinos aguas estancadas o provenientes de derrames o inundaciones (Dirksen y col., 2005).

El ensilaje de estiércol de pollo es una fuente poco costosa de proteínas y nitrógeno no proteico, pero su valor energético es bajo. El *Clostridium botulinum* no crece a pH menor de 5 y la toxina es destruida por debajo de este pH. Para que el estiércol de pollo ensilado logre un pH de 5 o menor se debe mezclar una fuente de energía como cebada, malta, papas o melazas al inicio del proceso de ensilaje para promover la formación de ácido. Se debe verificar el pH del producto antes de suministrarlo. El ensilaje en grandes fardos es una fuente potencial de Botulismo, pero no se esperan problemas en el ensilaje bien fermentado (Jones, 1991).

Reglas generales para una correcta cosecha del pasto para ensilaje:

- Arar el campo.
- No ensilar con clima húmedo.
- Dejar marchitar el pasto cortado por 24 horas antes de ensilarlo.
- Revisar la envoltura plástica para corroborar que no tengan roturas.
- Si está en estado de descomposición antes de administrar el alimento a los animales debe chequearse su pH.

La administración de una dieta adecuada puede ser una medida profiláctica. En algunas partes del mundo los brotes de Botulismo pueden estar causados por pica debido a una dieta deficiente en fósforo. No se debe permitir que los animales afectados formen parte de la cadena alimenticia del hombre, aunque la toxina termosensible vaya a ser destruida por los procesos normales de cocción (Jones, 1991; 2000).

Las esporas de *Clostridium botulinum* no se destruyen por pasteurización. El microorganismo puede reproducirse en quesos con bajo contenido de sal, pH relativamente alto y una estructura cerrada. La fuente de esporas en este caso será la contaminación de la leche (Jones, 2000). La posibilidad de eliminar toxinas por leche en bovinos con cuadros de Botulismo, es una teoría consensuada entre diferentes autores. Muchos de ellos recomiendan el descarte de la leche de los lotes afectados por un tiempo no menor de 14 días luego del último caso clínico (da Costa, 2008).

La eliminación de cadáveres del campo es una medida auxiliar importante porque impide la osteofagia y la posible ingestión de toxinas. Los cadáveres deben ser quemados completamente. No se recomienda el enterramiento de cadáveres, pues existe el riesgo que el perímetro se convierta en una fuente potencial de contaminación. Además animales silvestres pueden desenterrar los cadáveres. Debe ser un esfuerzo conjunto entre vecinos pues los huesos de animales muertos son fácilmente transportados por animales silvestres o por el agua (Riet-Correa y Gevehr, 2002).

Mejora nutricional y otros métodos, en condiciones de pastoreo extensivo donde las aplicaciones de fertilizantes son antieconómicas, la corrección de la conducta de osteofagia en los animales debe estar basada en el suministro de sales mineralizadas, adecuadamente diseñadas para las condiciones de cada región. No obstante, lo más recomendable es realizar un

balance de minerales en la dieta de animales en una región específica y a partir de él, hacer la formulación (Ortiz y Benavides, 2002).

13.1. Inmunización

La posibilidad de proteger al ganado frente a este microorganismo utilizando filtrados de toxina inactivada (toxoides) fue descrita a inicios del siglo pasado, para el caso del ganado vacuno y ovino en Australia por Bennetts en 1928. Para su empleo en los animales domésticos, los toxoides fueron preparados con toxinas de las cepas de los tipos C y D, se inactivaron con formalina y se utilizó como adyuvante el hidróxido de aluminio.

Sudáfrica fue el primer país que dispuso de este método de inmunización y en 1971 fueron utilizadas 5 millones de dosis en el país. En 1985 el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Argentina) llevó a cabo labores para la elaboración de una vacuna nacional, la cual fue comparada con vacunas importadas desde Brasil, con excelentes resultados (Zurbriggen, 1985).

Los rebaños de ganado de Israel han sido vacunados contra el *Clostridium botulinum* tipo C y D desde finales de 1970. En junio de 2002, un gran brote de Botulismo tipo D, produjo en el sur de Israel, grandes pérdidas económicas. Todos los animales fueron vacunados con un toxoide bivalente, usando el protocolo de vacunación recomendado: dos dosis separadas por cuatro semanas a la edad de dos meses, seguidas de un refuerzo anual. Los terneros de dos meses de edad, se vacunaron mediante inyección subcutánea con una de las marcas comerciales disponibles para toxoides tipo C y D bivalentes (CSL Limited, Parkville, Victoria, Australia; Prondil S.A., Montevideo, Uruguay).

Las razones para el fracaso de la vacuna eran desconocidas, y se plantearon las siguientes hipótesis: (i) insuficiente calidad de las vacunas, (ii) protocolos inadecuados de vacunación, (iii) exposición a niveles muy altos de BoNT contra el que la vacuna no era eficaz, y (iv) la intoxicación con tipos de BoNT no incluido en la vacuna. Con el fin de determinar los niveles de anticuerpos específicos anti-BoNT tipo D, se utilizaron sistemas de ELISA, el cual se considera un medio eficaz y adecuado para analizar las respuestas inmunológicas a las toxinas botulínicas.

En rebaños no afectados, los niveles de anticuerpos fueron significativamente mayor en vacas multíparas vacunadas que en vacas primíparas vacunadas. Se detectaron marcadas variaciones en anticuerpos de terneros nacidos no inmunizados de uno a cinco meses de edad, de madres vacunadas contra la neurotoxina botulínica tipo D.

Se concluyó que los toxoides botulínicos pueden conferir adecuada protección contra la exposición natural a dosis letales de BoNT tipo D. Sin embargo, los protocolos de vacunación utilizados en las granjas lecheras resultaron insuficientes y debieron optimizarse (Steinman y col., 2006).

La vacunación es una forma importante de control, pero debe tener eficiencia comprobada. Los animales pueden ser vacunados a partir de los cuatro meses

de edad y revacunación dentro de treinta a cuarenta días dependiendo del tipo de vacuna utilizada y de la incidencia de la enfermedad en la región. La vacuna presenta un período negativo de aproximadamente 18 días, durante el cual los animales no deben ser colocados en pasturas contaminadas. La vacunación no debe ser usada como una medida aislada de profilaxis, pues su eficiencia es limitada frente a la ingestión de dosis muy altas de la toxina. La vacunación previa es recomendada, también, para bovinos confinados o semiconfinados que son alimentados con cama de pollo. Como medida auxiliar, todos los cadáveres de animales muertos deben ser retirados de la cama antes de esta ser estocada (Riet-Correa y Gevehr, 2002).

En los animales criados a pastoreo es fundamental la corrección de deficiencias nutricionales. Administración de complementos de fósforo o proteínas, si las condiciones lo permiten, la eliminación higiénica de los cadáveres para prevenir una mayor contaminación de la pastura; pero puede que esto no se pueda llevar a cabo en el régimen de dehesas.

La vacunación se realiza con el toxoide específico del tipo causal o combinado (bivalente C y D) en las áreas enzooticas. La inmunidad aportada por la vacunación es específica del tipo de *Clostridium*. El número e intervalo de la dosis requerida varía con la vacuna, por lo que hay que seguir las indicaciones del fabricante (Radostits y col., 2002).

Un problema frecuente que surge cuando aparece la enfermedad como consecuencia de alimentar a los animales con ensilado, heno u otros alimentos contaminados es que hacer con el resto del alimento, pues puede quedar una gran cantidad. En estas circunstancias, hay que vacunar intensamente al rebaño con un toxoide en tres ocasiones, con dos semanas de intervalo, y luego se puede volver a alimentar con el mismo producto (Radostits y col., 2002).

Debido a que en nuestro país se está utilizando cada vez más el engorde de animales en confinamiento, se recomienda tener en cuenta como medida preventiva antes de realizar estos tipos de manejo, analizar el estado de conservación de los alimentos y considerar el uso preventivo de vacunas que contengan toxoide botulínico tipo C y D en su composición (Bermúdez y col., 2014).

No hay en la actualidad muchos países que produzcan vacunas para la inmunización contra ésta enfermedad, Argentina, Brasil, Uruguay (Anexo 1) y Nueva Zelanda son los únicos fabricantes. EE.UU. produce un tipo monovalente para el tipo C (Bermúdez, 2016).

La vacuna es un producto inactivado, elaborado con cepas toxigénicas de *Clostridium botulinum* del tipo C y D. Contiene toxoides C₁, C₂ y D, adjuvados en hidróxido y fosfato de aluminio. Cada dosis bovina de vacuna debe cumplir con los estándares mundiales de referencia. Para esto se utilizan medios de producción específicos y procedimientos de estricto control en todos los pasos del proceso industrial. La calidad de la toxina y su potencia nos indica la calidad final del producto. La medición de calidad se efectúa mediante técnicas de laboratorio, como floculación en tubo y biológicas, sobre ratones blancos. Estos

últimos presentan una sintomatología típica: estrechamiento de los flancos (abdomen), flaccidez de los miembros posteriores, pelo erizado, y en última instancia flaccidez total y muerte. Deben realizarse controles estrictos de inocuidad sobre la especie a la cual está destinado el producto, en este caso los bovinos (Laeniz y Calvo, 2003).

En Uruguay la vacuna presente en el mercado se conoce con el nombre de CLOSTRISAN 11 (Laboratorio Santa Elena), vacuna inactivada para la prevención de 11 antígenos clostridiales. Es una suspensión de antígenos inactivados de *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi* tipo B, *Clostridium perfringens* tipo A, B, C y D, *Clostridium septicum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium sordelli* y *Clostridium botulinum* tipo C y D, adsorbidos en hidróxido de aluminio (Disponible en: http://www.santaelena.com.uy/ucv_176_1.html).

Desde el punto de vista legal no hay obligatoriedad de vacunación contra las enfermedades Clostridiales en nuestro país, el Decreto 118/12, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) del 31 de Julio del 2012, hace referencia al control sanitario de los campos de cría, donde se especifica 30 días posteriores al ingreso de los animales al establecimiento, el veterinario de libre ejercicio debe efectuar la vacunación contra Carunco sintomático, y posterior revacunar anual de todo el rodeo bovino susceptible, y el egreso de estos con el certificado expedido por el veterinario de libre ejercicio que ha de constatar dicha vacunación (MGAP, 2012).

13.2. Esquema de vacunación

Se deben vacunar animales mayores de 1 año, que serán vacunados por primera vez aplicando 2 dosis con 15 a 30 días de intervalo (según recomendaciones del laboratorio productor del biológico). En animales vacunados previamente es suficiente la revacunación anual.

En terneros de vacas no vacunadas se recomienda la primovacuna a partir de los 15 días de vida, mientras que los terneros de madres inmunizadas previamente, la primera dosis se administra a partir de los dos meses de vida. En hembras gestantes la inmunización ya sea primovacuna o revacunación anual se debe realizar 15 días preparto, para una efectiva transferencia de anticuerpos calostrales como se indica en la tabla 6, indicado por fabricantes del reactivo presente en el mercado uruguayo (www.santaelena.com.uy/andocasociado.aspx?8,7313).

Se recomienda tomar en cuenta el período de mayor incidencia de la enfermedad para la vacunación, para inmunizar como mínimo 30 días antes del mismo, en el mes de setiembre. Ya que la mayoría de los casos se ven en verano (Draghi, 2000). Estas indicaciones están preparadas para sistemas extensivos de producción, en casos de sistemas intensivos se recomienda la revacunación semestralmente.

Tabla 6. Plan de vacunación tentativo para bovinos.

Vacunación de Bovinos

	Terneros de vacas vacunadas	Terneros de vacas no vacunadas	Vacas gestantes
1° dosis	2 meses	15 días	2 meses parto.
2° dosis	21-30 días después de la 1° dosis.	21-30 días después de la 1° dosis.	2 - 4 semanas parto.
Revacunación	Anual	Anual	2 - 4 semanas parto.

Fuente: Folleto Clostrisan 11. Disponible en:
www.santaelena.com.uy/andocasociado.aspx?8,7313.

ESTUDIO DE CASO: MORTALIDAD DE BOVINOS EN CONFINAMIENTO.

15. HIPÓTESIS

Determinar la causa de mortalidad en animales alimentados en confinamiento con una dieta compuesta por silo, concentrado y bloque proteico. La causa de muerte podría ser debido a una intoxicación por *Clostridium botulinum* tipo C o D.

16. OBJETIVO GENERAL

Determinar una metodología de estudio para esta presentación y casos similares.

16.1. Objetivos particulares

- 1) Descripción de la epidemiología del caso, así como la sintomatología clínica y anatomía patología.
- 2) Con el fin de lograr una metodología a seguir en futuros casos o brotes, creemos de importancia la descripción de las posibles pruebas diagnósticas en el laboratorio.
- 3) Y por ultimo resulta fundamental la descripción de medidas de prevención y control para este caso y futuros brotes.

17. MATERIALES Y MÉTODOS

17.1. Predio en estudio

El estudio del caso fue realizado en el establecimiento agropecuario, propiedad del señor Walter Bruzzone. Ubicado en el paraje "Ombúes de Bentancour" sobre el empalme de ruta 12 y ruta 108 a la altura de km 96.500, límite entre los departamentos de Lavalleja y Canelones, seccional policial 13 y 8 respectivamente.

17.2. Epidemiología

Los casos se presentaron en corrales ubicados en una cantera a 5 km del casco del establecimiento. La infraestructura fue creada con el fin de mantener estabulados doscientos terneros loteados por sexo. Las instalaciones se encontraban sobre suelos ácidos, presentaban bebederos con bolla (figura 14), con agua bombeada de una aguada cercana (Figura 15). Los terneros cruza Braford consumían una dieta balanceada para los requerimientos de la categoría.

Figura 13. Instalaciones del feed lot, donde se encontraban los terneros.



Fuente: generosidad del Dr. Raúl Oyenard.

Figura 14. Fuente de agua.



Fuente: generosidad del Dr. Raúl Oyenard.

El predio tiene una extensión de 330 hectáreas, de las cuales un treinta % presenta mejoras. El establecimiento, casi en su totalidad se corresponde con la clasificación 10.8b de suelos. Este grupo consiste mayoritariamente de las tierras onduladas suaves de los departamentos de Canelones y San José. El relieve es suavemente ondulado a ondulado con predominio de pendientes. (D.S.F.). Índice de Productividad 105.

Debe indicarse que esta región ha sido la primera en incorporarse a la agricultura en el País y en este suelo existe laderas convexas, con sus respectivas concavidades, donde naturalmente el riesgo de erosión es alto y se

han realizado cultivos anuales (entre ellos estivales carpidos), en forma continua y sin ninguna medida de conservación de suelos. Éstas han sido las causas de la erosión severa y en algunas áreas muy severas que existen actualmente, identificándose con la presencia de un padrón de cárcavas de densidad alta y muy alta, y suelos con erosión laminar en diversos grados.

Los suelos corresponden a Vertisoles Rúpticos Típicos y Lúvicos (Grumosoles) y Brunosoles Éutricos y Subéutricos Típicos (Praderas Negras y Pardas medias), de color negro o pardo muy oscuro, textura franco arcillo limosa, fertilidad alta y moderadamente bien drenados (<http://www.cebra.com.uy/renare/media/Descripci%C3%B3n-de-Grupos-de-Suelos- CONEAT-1.pdf>).

17.3. Motivo de consulta

Uno de los trabajadores encontró un ternero sobre año, echado en julio del 2013 (figura 16), alerta y presentaba problemas para ver. Más tarde, caen dos machos más y una hembra".

Figura 15. Ternera en decúbito esternal.



Foto: gentileza Dr. Raúl Oyenard, 2013

17.4. Antecedentes del caso

El predio problema tiene como objetivo productivo el ciclo completo, donde la recría se realiza en confinamiento. El campo donde se realiza la cría de los animales se encuentra a 70 km del establecimiento. En el momento del brote el predio manejaba cuatro lotes de animales diferentes, como se detalla en la tabla 7. Los terneros mayormente cruza Braford, se destetan entre enero y marzo. En un comienzo los terneros eran encerrados en praderas con bebederos, en junio se encierran loteados en machos y hembras, donde se los

complementaba con fardo y sorgo húmedo. Se colocaron instalaciones adecuadas para el confinamiento de los terneros, ubicados en una cantera, pero en corrales diferentes machos y hembras. Donde se los alimento con una mezcla de núcleo SB500 de laboratorio Cibeles, sorgo grano húmedo y fardo, producidos en el establecimiento.

Tabla 7. Categorías de animales en engorde.

Categoría de animales	Dietas administradas
Vaquillonas de invernada	Sorgo grano húmedo y pradera.
Novillos de invernada	Silo pack de alfalfa, sorgo grano húmedo y pradera.
Vacas gestantes	Silo pack de moha, grano húmedo de sorgo y campo natural.
Terneros/as en recría	Silo pack de alfalfa y moha, grano húmedo de sorgo y núcleo proteico.

Fuente: Botulismo en bovinos en confinamiento. Bermúdez y col., 2014.

Al momento del brote los animales se encontraban en etapa de acostumbramiento al alimento, los comederos fueron fabricados de chapa y medios tanques, que se limpiaban diariamente.

La sanidad de los animales del lote se basaban en desparasitación con moxidectina al destete, al ingreso al corral después de la castración (la castración se realiza al mes de llegar al campo) doramectina 1%, a la salida del invierno y en diciembre. También se trata con Tilmicosina administrada por vía subcutánea para Queratoconjuntivitis.

El mixer utilizado para la alimentación de los terneros estabulados fue adquirido quince días antes del encierro de los mismos. El fundamento de la adquisición se estableció en que los fardos presentados en pinchos para la alimentación de los animales, sumaron una pérdida de un treinta %de la producción de fardos anuales, por pisoteo (figura 17). En el mixer se procesaban aproximadamente 900kg de silo pack, 500 kg de sorgo húmedo, 25 kg de núcleo proteico y agua para ayudar en la mezcla para la alimentación exclusiva de los terneros.

Figura 16. Mixer del establecimiento agropecuario.

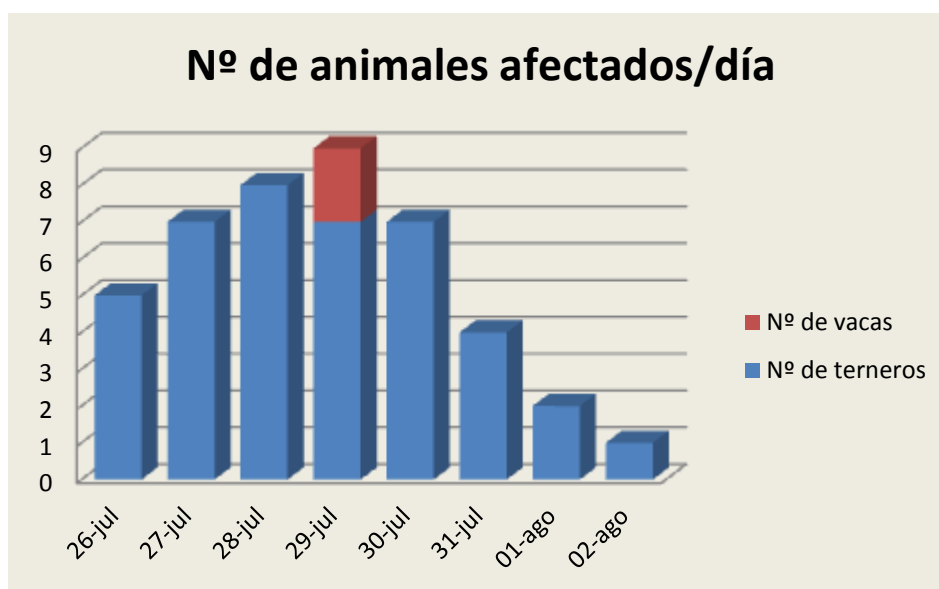


Fuente: gentileza Dr. Raúl Oyenard, 2013.

El viernes 26 de julio en horas de la mañana se encontró un animal en decúbito esternal, y posteriormente ese día se encontraron 4 terneros más, con la misma sintomatología. El profesional responsable del predio decide disminuir la cantidad de alimento brindada a los. A la mañana siguiente se encontraron siete terneros en decúbito esternal y se resuelve retirar el alimento debido a sospecha de enfermedades carenciales. A su vez se da el contenido sobrante del mixer a un lote de sesenta vacas gestadas, que se encontraban pastoreando una pradera de moha a unos 6 kilómetros. Posteriormente se encontraron ocho terneros más con la misma sintomatología. Tres días después de los primeros animales afectados se hallaron en decúbito dos vacas gestadas del lote de sesenta animales y siete terneros del feed lot. El martes 30 de julio se encontraron siete terneros con la sintomatología. Conforme pasaron los días fueron disminuyendo los casos, hasta no encontrarse ningún animal con sintomatología clínica.

Días antes de la aparición de los primeros animales con sintomatología, se observaron terneros consumiendo tierra y cama del encierro del año anterior. Debido a esto, inicialmente se sospechó de un proceso anaeróbico en las camas de años anteriores o incluso intoxicación por urea.

Figura 17. Cronología de los bovinos afectados.



17.5. Descripción de la sintomatología clínica

Al inicio del brote se observaron animales en decúbito esternal, con debilidad y anorexia. Debido a la cronología de los casos, fue posible observar animales que se separaban del rodeo, con incoordinación, marcha insegura, debilidad y ataxia. Posteriormente, los bovinos quedaban en decúbito esternal, siendo incapaces de levantarse, manteniéndose en decúbito esternal un tiempo variable (de dos a seis días), con la cabeza hacia uno de los flancos (autoauscultación) (figura 19). Parálisis muscular flácida en las extremidades posteriores, progresando hacia extremidades anteriores, cabeza y cuello. Estaban alertas pero no podían pararse. En algunos casos protrusión de la lengua, sialorrea e incapacidad deglutoria (figura 20). Con el pasar del tiempo los animales pasaron a un decúbito lateral, con paresia muscular generalizada, afectando el tracto digestivo. No presentaron un cuadro febril marcado, pero se describió pérdida de la sensibilidad cutánea y parálisis de los párpados (figura 21).

Figura 18. Bovinos en diferentes estadios de la enfermedad.



Fuente: Gentileza del Dr. Alejandro Rodríguez.

Figura 19. Ternero con protrusión de lengua.



Fuente: gentileza del Dr. Raul Oyenard, 2015.

Figura 20. Parálisis de los párpados.



Fuente: gentielza, Dr. Alejandro Rodríguez.

17.6. Metodología de diagnóstico realizada

17.6.1. Necropsia a campo:

Una herramienta diagnóstica de mucha utilidad para diferentes enfermedades presentes en los bovinos es la necropsia. En este caso se llevo a cabo la necropsia el 02 de agosto de 2013 en el Laboratorio Veterinario del Este DILAVE “Miguel C. Rubino” Treinta y Tres, de un ternero que presentaba la sintomatología problema. Luego de realizar la ficha clínica correspondiente, se sacrifico y la necropsia estuvo a cargo del Dr. F. Dutra, los hallazgos clínicos y la ausencia de lesiones anatomopatológicas fueron compatibles con un cuadro de Botulismo. Siendo este el diagnóstico presuntivo indicado por el veterinario actuante (Anexo 2, informe de necropsia DILAVE). Se llevo a cabo el análisis para Encefalopatía espongiiforme bovina y Rabia en el DILAVE Central (Montevideo, Ruta 8), los que dieron negativos.

El Doctor Raúl Oyenard se puso en contacto con el Dr. Julián Bermúdez, quien se hace presente en el predio junto al equipo técnico del Laboratorio Santa Elena. Procedieron a realizar una necropsia parcial, enfocada al diagnóstico presuntivo de Botulismo.

Para realizar este paso tan importante en el diagnóstico se basaron en lo descrito por Sterne y Batty, en el libro Clostridios patógenos (1978), el cual utilizamos como guía para dicho procedimiento.

En primera instancia se realizó una ficha clínica, que cuente con información a forma de guía: la especie animal, raza, edad, sexo y el número de animales afectados, así como la duración del brote. Si existieren antecedentes de un caso similar en las proximidades se debe adjuntar, la historia inmunológica del rebaño (número de veces que los animales han sido inmunizados, nombre del fabricante de cada uno de los profilácticos utilizados).

Debe ser extendido un informe de la necropsia, indicando si la misma fue realizada de forma completa o parcial (llámese completa a aquella en la cual se analizaron todos los órganos y sistemas, aunque solo se mencionen en el informe los hechos patológicos; mientras que la necropsia de tipo parcial indica que solo se estudiaron los órganos que hacen referencia en el informe).

Es de importancia evaluar en primer lugar la posición en la cual se encuentra el cadáver, en nuestro caso el animal fue sacrificado, en posición de decúbito esternal.

A la inspección de la piel no se hallaron lesión provocada por ectoparásitos (garrapata), ni lesiones de otro tipo. Se pudo evidenciar un marcado deterioro de la condición corporal, parálisis de los párpados y una intensa sialorrea. Luego de la inspección pertinente se procedió a la apertura de la cavidad abdominal, la cual se realizó con el animal situado sobre su flanco derecho, realizándose una incisión desde el borde de la pelvis hasta el cartílago xifoides, y una segunda incisión posterior y paralela a la última costilla, sin encontrarse alteraciones específicas de ninguna índole. Fue necesario separar los ligamentos del rumen e intestino para poder extraerlos de la cavidad abdominal, junto con el bazo. Al inspeccionar de los pre-estómagos, la única alteración observada fue la impactación del librillo (Figura 22). Posteriormente se extrajo el hígado, los riñones y las glándulas suprarrenales. Se realizó la apertura y el examen de la totalidad del tracto intestinal luego de liberarlo del mesenterio, evaluando color, consistencia y cantidad de contenido así como el aspecto de la membrana mucosa. A la inspección de la vejiga, esta se encontraba plétórica.

Figura 21. Impacción de Librillo (omaso).



Fuente: gentileza Dr. Rafael Silva, 2016.

La cavidad torácica fue separada hacia la parte dorsal lo que permitió poner dicha cavidad al descubierto, sin encontrarse alteraciones.

En los cuadros producidos por Clostridios suele obtenerse un mayor resultado con el estudio de la piel, el tejido muscular, el tracto intestinal, la vejiga, los

órganos parenquimatosos y la cavidad torácica, incluyendo el corazón y sus membranas, no así el examen de la cabeza, cráneo y cuello, ya que no suele generalmente dar grandes resultados (Sterne y Batty, 1978).

Cuando se van a transportar muestras para exámenes microbiológicos es necesario inhibir la multiplicación bacteriana y evitar la destrucción de la flora existente, mientras que para el caso de investigación de tipo inmunológico, lo que se busca es evitar la multiplicación, de forma que las toxinas y los antígenos no sean alterados. A su vez, cuando se envían las muestras al laboratorio es necesario que éstas estén correctamente empaquetadas e identificadas siendo deseable que el examen de la muestra se haga lo más rápido posible. Previo a su análisis toda la información que se tenga disponible (historia, informe de necropsia, entre otras) debe ser reconsiderada por una persona especializada, ya que esto puede poner de manifiesto algún detalle que no haya sido considerado por el remitente y que pueda resultar muy significativo.

En este caso el material recolectado para análisis en el laboratorio fue contenido de ciego refrigerado y 20 ml de sangre refrigerada. Además se recogieron muestras de los diferentes componentes de la dieta de los animales y agua de los bebederos. Todas las muestras fueron colocadas en recipientes estériles, cerrados herméticamente y correctamente rotulado.

Todo el material fue enviado al Laboratorio del Departamento de Ciencias Microbiológicas de Facultad de Veterinaria UdelaR, y posteriormente derivado al Laboratorio Santa Elena Virbac. El Dr. Julián Bermúdez quién formaba parte del equipo de extensión técnica del laboratorio, es quién como docente de la Facultad de Veterinaria nos hace participar del caso.

17.6.2. Diagnóstico de Laboratorio:

El diagnóstico exige una gama de medios que aseguren el crecimiento satisfactorio y la producción de toxinas en cantidad suficiente para poder hacer las tipificaciones que sean necesarias.

17.6.2.1. Estudios toxicológicos

Los materiales fueron remitidos al Laboratorio del Dpto. de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria, para luego ser derivados al Laboratorio Santa Elena-Virbac®, donde fueron procesadas y conservados entre 4 y 8 °C durante la realización de los estudios toxicológicos y microbiológicos tendientes a la identificación y tipificación de la toxina botulínica.

Muestras de sangre: La sangre colectada fue centrifugada por 10 minutos a 10000 rpm (revoluciones por minuto) y el suero sobrenadante fue refrigerado a 4 °C. Posteriormente fue inoculado en un volumen 0,25ml en ratones en horario matutino.

Muestras de ciego: Al contenido de ciego se le colocó un buffer pH 7 durante 24 horas a temperatura ambiente. Inmediatamente se centrifugó y el sobrenadante producido se filtró por 0,2 micras, con el fin de eliminar la

presencia de bacterias contaminantes. Luego fue inoculado en ratones blancos un volumen conocido de 0,20 a 0,25 ml, administrado de forma intraperitoneal. Los animales quedaron en observación.

Muestras de alimento y agua: Las muestras se trituraron en un mortero con el agregado de un buffer de gelatina, obteniéndose una suspensión homogénea que se dejó por 18 horas a 4 °C. Posteriormente se clarificó por centrifugación a 3000 G y se filtró por membrana esterilizante Millipore de 0,22 m, inoculándose dos ratones blancos adultos por vía intraperitoneal con 0,5ml de cada muestra. El agua se inoculó en ratones y se cultivo.

Los ratones inoculados con las diferentes muestras recolectadas, fueron observados durante 10 días registrándose diariamente síntomas clínicos y muertes, dejándose en todos los casos animales control sin inocular. Debido a la presencia de los síntomas se realizó tipificación, con el fin de identificar la toxina actuante en el caso.

La utilización de animales para actividades experimentales e investigación científica se establecen en el marco regulatorio nacional en la ley 18.611 del 2 de Octubre del 2009, la cual se denomina Ley de Experimentación Animal. En el capítulo IV de dicha ley, en los artículos del 12 al 17 se especifican las condiciones de cría y uso de animales para enseñanza e investigación científica, quienes quedan autorizadas para tal uso son las instituciones registradas ante la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA), estando el Laboratorio Santa Elena-Virbac autorizada por dicha entidad (Casaux y col., 2013).

Seroneutralización

Los materiales que provocaron síntomas y/o muerte se los inactivó por calor y se neutralizaron con antitoxina botulínica de los tipos C y D. Para la inactivación por calor se pusieron las muestras en recipientes estériles y se inactivaron durante 10 minutos a 100° °C inoculándose luego 0,5ml en dos ratones, paralelamente se inocularon dos ratones con el mismo material sin inactivar, los que actuaron como controles de prueba.

Para la seroneutralización se utilizaron sueros antitoxinicos tipos C y D del "Veterinary Research Institute, Onderstepoort, de Sudáfrica". Los sueros se diluyeron hasta un nivel de 10 U.I./ml y se enfrentaron en los volúmenes de 0,1ml de suero con 0,5ml de la muestra dejándose en incubación a 37 °C durante 60 minutos. Luego se inocularon ratones con 0,6ml de la mezcla por vía intraperitoneal, inoculándose paralelamente ratones con las muestras sin neutralizar. En los casos de protección cruzada de los tipos C y D se hizo seroneutralización con niveles de antitoxina de 0,5 y 0,25 U.I.

17.6.2.2. Estudios microbiológicos

De los macerados usados para el estudio de toxina, se les realizó tratamiento con etanol al 97 %en partes iguales, dejándolos por una hora a temperatura ambiente y agitándolos cada 15 minutos, luego se inocularon dos tubos con medio Cooked Meat, siendo uno de ellos tratado por calor a 70 °C durante 10 minutos, luego se incubaron a 37 °C durante 24 horas, observándose turbidez y

producción de gas. Terminada la incubación se realizaron frotis teñidos por el método de Gram, para diferenciar de otras bacterias. Se plaquearon en Agar sangre en anaerobiosis, se eligieron colonias típicas y se sembraron en medio Cooked Meat, el sobrenadante fue centrifugado a 3000 G y filtrado por membrana de 0,22 m, se inocularon dos ratones con 0,5 ml por vía intraperitoneal para cada tubo de cultivo.

17.7. Tratamiento y medidas de control

Se procedió a la vacunación y revacunación con CLOSTRISAN 11 como método preventivo a los animales sobrevivientes y al resto del ganado presente en el establecimiento.

El tratamiento paliativo realizado a los animales con sintomatología consistió en administrar antibiótico Terramicina de Larga Acción (principio activo oxitetraciclina), comida y agua, además se los hidrato por vía intraperitoneal y se les administro fructosa. Se tomo como medida de control una fosa sanitaria para depositar los cadáveres (figura 23), y se les agrego soda caustica (figura 24).

Figura 22. Grupo de bovinos muertos por Botulismo.



Fuente: gentileza del Dr. Raul Oyenard, 2015.

Figura 23. Fosa Sanitaria.



Fuente: generosidad del Dr. Raul Oyenard, 2015.

18. RESULTADOS

El Botulismo es una enfermedad esporádica en nuestro país. En este brote se pudo llegar a un diagnóstico presuntivo de Botulismo gracias a la suma de información brindada por la anamnesis, epidemiología, sinotomatología y patología.

La necropsia fue posible determinar que la falta de lesiones en la mayoría de los órganos eran orientativas de Botulismo Bovino. Se hace mención únicamente al buen desarrollo muscular de la carcasa, y reservas grasas completas. El contenido de los pre estómagos estaba muy digerido. En la redcilla se observaron restos de tierra y piedras, también se observó la impactación del librillo. No se hallaron otras lesiones patológicas de interés en el resto de los órganos. Macroscópicamente el S.N.C (Sistema nervioso central) y la médula ósea estaban normales.

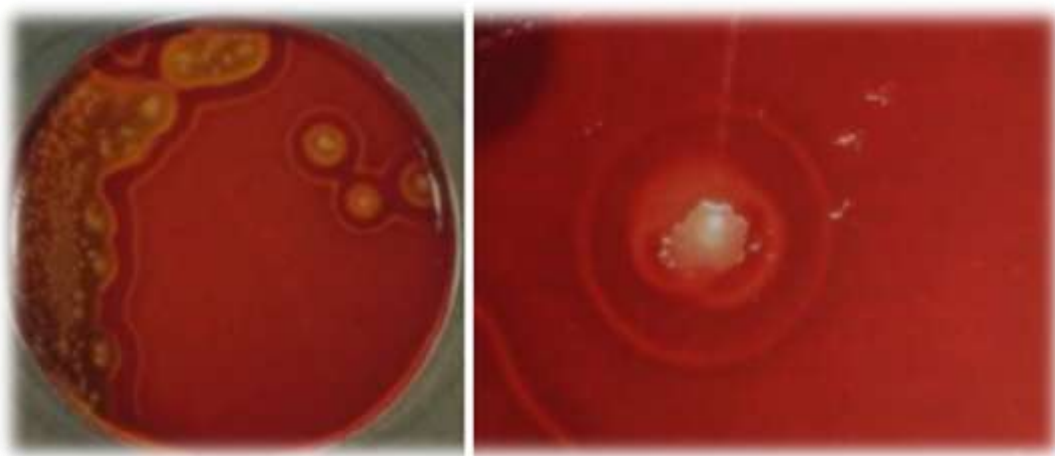
Del crecimiento obtenido en el medio Cooked Meat y de las colonias obtenidas en las placas de agar sangre (figura 25), mostraron la presencia de bacilos Gram positivos, con esporas subterminales.

La seroneutralización de todos los materiales estudiados, las muestra de contenido intestinal y suero sanguíneo de los animales resultaron positivos, causando síntomas típicos de Botulismo y muerte dentro de las 24 y 48 horas en los ratones inoculados. La seroneutralización con niveles de 0,5 U.I. de antitoxina, solo ocurrió protección para la toxina tipo D.

El cultivo en medio líquido (figura 26) dio positivo a toxinas, se hizo tipificación y dio positivo a toxina botulínica tipo D. Dicho efecto patogénico fue inactivado a 100°C por 10 minutos y por la neutralización con antitoxina botulínica de tipo D a nivel de 1 U.I.. No se pudo determinar la presencia de este agente ni de la toxina en el material compatible con alimentos de la dieta.

Las medidas profilácticas fueron vacunación y revacunación, los animales permanecieron en las instalaciones y siguieron consumiendo el mismo alimento. Las medidas profilácticas también confirman el diagnóstico, dado que no aparecieron más casos clínicos.

Figura 24. Colonias de *Clostridium botulinum* en medio Agar sangre.



En la figura de la izquierda se observan colonias circulares con bordes irregulares, traslucidos o semiopacos, rodeadas de una pequeña zona de hemolisis. A la derecha podemos ver un primer plano de una colonia de *Clostridium botulinum* tipo C en agar sangre de oveja que muestra beta- hemolisis y una colonia colmada, irregular con una superficie granular.

Figura 25. Medio de enriquecimiento Cooked Meat.



19. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El Botulismo es una enfermedad de origen tóxico de los animales domésticos y el hombre, causada por la ingestión de toxinas producidas por el *Clostridium botulinum* (Simmons, 1964; Smith, 1980; Bermúdez y col., 1991). Si bien la mayoría de las especies animales son susceptibles a las diferentes toxinas botulínicas, es en las especies productoras de alimento donde el Botulismo adquiere un especial interés, por la importancia económica que tiene para la producción pecuaria de la región, entre ellos nuestro país (Leaniz y Pasini, 1987).

De los siete diferentes tipos de toxina botulínica, los tipos C y D revisten mayor importancia en los animales domésticos. En Uruguay se han encontrado estos tipos en bovinos, aves de corral, caninos y equinos, por otra parte en cerdos no fue posible la tipificación, dando negativo a los tipos de toxina C y D.

Los casos descritos en bovinos hasta el momento en nuestra región, estaban asociados a Botulismo enzootico, debido a la carencia de fósforo (pica), por toxina tipo D (Zurbriggen y col., 1985; Riet- Correa y Gevehr, 2002; Leaniz y Calvo, 2003; Dirksen y col., 2005; Bermúdez y col., 2006). Se registró por primera vez un caso de intoxicación debido a la contaminación de alimentos, dándose el mismo en animales jóvenes, en confinamiento (Bermúdez y col., 2014).

El Botulismo que se describe en este caso de estudio teniendo en cuenta los datos epidemiológicos, la aparición de la sintomatología clínica a los pocos días de la ingesta del alimento. Esto induce a pensar que la intoxicación se debe a la contaminación de los alimentos que consumían los animales.

Una vez más la sintomatología clínica es el hallazgo más preciso para diagnosticar esta enfermedad. La información obtenida en la necropsia no aportan datos significativos, dado que no existen lesiones macroscópicas ni microscópicas por intoxicación con *Clostridium botulinum* (Lisbôa y col., 1996; Dirksen y col., 2005; Leaniz y Calvo, 2003). En los casos asociados a pica, la presencia de cuerpos extraños como piedras y huesos en retículo, rumen y abomaso son indicativos de la enfermedad (Draghi, 2000; Radostits y col., 2002; Leaniz y Calvo, 2003; Dirksen y col., 2005). Sin embargo, tiene importancia diagnóstica ya que permite diferenciar este tipo de intoxicación de otras enfermedades (Bermúdez y col., 2006).

El hecho de no encontrar lesiones, es importante para diferenciar de otros tipos de enfermedades ya sean infecciosas u otros tipos de intoxicación (Bermúdez y col., 2006). Los estudios de laboratorio si bien confirman la etiología de este caso, no pudieron determinar el o las muestras de alimentos que estaban contaminados.

Los resultados obtenidos en el laboratorio consiguieron identificar y aislar el *Clostridium botulinum* tipo D. Confirma que la metodología a campo, muestreo y métodos de laboratorio fueron eficientes para identificar la causa de este caso clínico. Sería útil que los laboratorios de diagnóstico tuvieran la infraestructura

necesaria para realizar estudios epidemiológicos y posteriores diagnósticos confiables, que permitirán un mejor uso de los recursos en el desarrollo y puesta en marcha de estrategias sostenibles para su control.

El caso descrito previamente de Botulismo enzootico la toxina tipo D se aisló de intestino y dieron negativos los estudios de suero sanguíneo. Cuando se trata de intoxicación aguda por consumo de alimento, si es posible encontrar toxina en el suero, lo que nos indica que son diferentes las muestras que se deben remitir al laboratorio teniendo en cuenta la epidemiología y el caso clínico.

En el contexto de nuestro caso se aisló por primera vez el *Clostridium botulinum* en muestras de intestino. Lo que permitió determinar que se trataba de un caso de toxiinfección, por la presencia de toxina en el alimento y posterior producción de toxina en el contenido intestinal. Este hallazgo permite inferir que altos niveles de toxina fueron absorbidos, lo cual facilitó su detección en suero sanguíneo.

La presencia de la toxina en los distintos órganos varía entre especies. Esto es debido a que no todos los animales son igualmente susceptibles a la toxina botulínica. Lo que indica que las muestras a remitir al laboratorio sean diferentes. En cerdos, aves y caninos es frecuente el hallazgo de toxina en suero, no así en bovinos y equinos donde rara vez se encuentra la presencia de toxinas en este tipo de muestras (Radostits y col., 2002; Bermúdez y col., 2016).

El método utilizado en todos los casos descritos en Uruguay es la inoculación en ratones. Esta técnica puede mostrarnos resultados negativos, debido a que el nivel de toxina que es capaz de intoxicar a un equino o a un bovino es más bajo que el nivel de toxina que intoxica a un ratón.

Los hallazgos de necropsia, el estudio epidemiológico y los resultados de laboratorio nos permitieron resolver la hipótesis planteada, determinando que la causa de muerte de los animales en estudio se debió a la contaminación de los alimentos consumidos y la infección por *Clostridium botulinum* de estos animales.

Este trabajo se describe una metodología de estudio, la cual podrá utilizarse en casos futuros, permitiendo un mayor entendimiento de la sintomatología clínica y técnicas diagnósticas, y por lo tanto es importante obtener un diagnóstico temprano y preciso para disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por estos Clostridios.

Uno de los objetivos de este trabajo es lograr implementar un tratamiento con medidas profilácticas y de control, basado en un diagnóstico temprano y preciso.

Frente a un brote de Botulismo por alimento contaminado, debemos inmunizar correctamente a los animales susceptibles, posibilitando así la reutilización del alimento problema (Radostits y col., 2002).

Debido a que en nuestro país se está utilizando cada vez más el engorde de animales en confinamiento, se recomienda tener en cuenta como medida preventiva antes de realizar estos tipos de manejo, analizar el estado de conservación de los alimentos y considerar el uso preventivo de vacunas que contengan toxoide botulínico tipo C y D en su composición (Bermúdez y col., 2014).

Podemos concluir que el diagnóstico de esta enfermedad es importante debido a que los sistemas de alimentación de rumiantes en Uruguay han cambiado conforme se intensifican los sistemas de producción. Con el fin de mejorar no solo la productividad si no también la rentabilidad del rubro, muchos productores han incorporado al sistema pastoril la suplementación alternativa como ensilajes, concentrados, entre otros. El anexo de estas tecnologías a la cadena de producción origina puntos vulnerables en el almacenamiento y la producción de los alimentos, aumentando los factores de riesgo.

Por tratarse de una enfermedad en la cual los microorganismos tienen carácter ubicuo, no existe otra forma de controlar la aparición de la misma, que por la aplicación de vacunas que tengan en su formulación toxoide botulínico tipo C y D. En el caso descrito al haber desaparecido los casos, nos demostraron que las medidas profilácticas dieron resultados al no aparecer más casos clínicos.

La mortalidad bovina causada por botulismo involucra una serie de medidas de prevención y de control, que no requieren de mucha inversión económica. Sería deseable que al momento de poner en funcionamiento este tipo de tecnologías pecuarias, sean tomadas en cuentas las recomendaciones descritas para prevenir posibles pérdidas económicas por brotes de la enfermedad.

ANEXO 1: Vacunas Clostridiales registradas en Uruguay.

Laboratorio	Nombre	Composición	Adyuvante	Estado	Dosis	Vía	Especie
Bayer	BAY BAC VISION MC	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	2mL	SC	Bovinos, ovinos y caprinos
	BAY BAC VISION EMG PLUS	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B y <i>D</i> , <i>perfringens</i> D	Acuoso	Inactivada	5mL / 2mL	SC / SC	Bovinos y Ovinos caprinos
Biogénesis	BIOCLOSTRIGEN J5	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>perfringens</i> C y <i>D</i> , <i>E. coli</i> J5	Acuoso	Inactivada	5mL / 2mL	SC / SC	Bovinos y Ovinos
	POLICLOSTRIGEN	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B, <i>perfringens</i> C y <i>D</i> , <i>sordellii</i> , <i>haemolyticum</i> y <i>E. coli</i> J5	Acuoso	Inactivada	5mL / 3mL	SC / SC	Bovinos y Ovinos
Hipra-Invet	TOXIPRA-S7	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> , <i>perfringens</i> B, C y <i>D</i> , <i>sordellii</i>	Oleosa	Inactivada	4mL	SC	Bovinos
					2mL	SC	Ovinos
Merial	SINTOXAN 9th	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B, <i>perfringens</i> B y <i>D</i> , <i>sordellii</i> , <i>haemolyticum</i> y <i>tetani</i>	Acuoso	Inactivada	3mL	SC	Bovinos, caprinos y ovinos
	ULTRAVAC	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B, <i>perfringens</i> D	Acuoso	Inactivada	4mL / 2mL	SC / SC	Bovinos y Caprinos ovinos
Microsules	CLOSTRIDIAL H+HEMOGLOBINURIA	<i>Clostridium haemolyticum</i>	Doble emulsión	Inactivada	-	-	Bovinos
Nutritex	CARBUMAN	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	-	SC	Bovinos, ovinos y suinos
	MANCHA Y GANGRENA GASEOSA PLUS	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B.	-	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
Pfizer	ULTRACHOICE 8	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> , <i>perfringens</i> C y <i>D</i> , <i>sordellii</i> , <i>haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	2mL	SC	Bovinos
					1mL	SC	Ovinos
Rosenbusch	BACTERINA HEMOGLOBINURIABACILAR	<i>Clostridium haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
	IR9	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> A, B y <i>D</i> , <i>perfringens</i> B, C y <i>D</i> ,	Acuoso	Inactivada	-	-	Bovinos, caprinos y ovinos
	MANCHA, GANGRENA GASEOSA Y ENTEROTOXEMIA	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>perfringens</i> C y <i>D</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
Santa Elena	DUPLEX	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	2mL	SC	Bovinos y suinos
					1mL	SC	Ovinos

	CLOSTRISAN	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens D, sordellii, haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	4mL 2mL	SC SC	Bovinos Caprinos y ovinos
	CLOSTRISAN 9+T	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens A, B, C y D, sordellii, haemolyticum y tetani</i>	Acuoso	Inactivada	5mL 2mL	SC SC	Bovinos Caprinos y ovinos
	CLOSTRISAN Ad yuvac	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens D, sordellii, haemolyticum</i>	Oleoso	Inactivada	4mL	SC	Bovinos
	CLOSTRISAN T	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens D, sordellii, haemolyticum y tetani</i>	Acuoso	Inactivada	4mL 2mL	SC SC	Bovinos Caprinos y ovinos
	TETANIC	<i>Clostridium tetani</i>	Acuoso	Inactivada	3mL 2mL	SC SC	Bovinos Caprinos y ovinos
	Uruguay	CARMANVET	<i>Bacillus anthracis y Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	-	-
POLIVET		Mancha, gangrena gaseosa y otras clostridiosis	-	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
TETANIVET		<i>Clostridium tetani</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos, caprinos y ovinos

Fuente: Vademécum de especialidades veterinarias, 2014.

ANEXO 2: Informe de necropsia, División Laboratorios Veterinarios (MGAP), Regional Este (Treinta y Tres), 2013.

MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA
 SUBDIRECCIÓN GENERAL DE LABORATORIOS

DILAVE
 División Laboratorios Veterinarios
 Dr. Miguel C. Rubino

INFERMEDAD DENUNCIABLE

Laboratorio de Treinta y Tres
 Informe de resultados de Ficha nº 12754

Jueves, 08 de Agosto de 2013

Dra. Raúl Oyernard
 -Mina

Estimado colega:
 Con referencia al material remitido:

Animal vivo	de	1	Bovino	Terro/a Hereford DL	para Necropsia
				7mes/es recibido el 2/8/13	
Organos refrigerados y/o en formal	de	2	Bovino	Terro/a	para Histopatología

propiedad de Bruzzone Eduardo, DICOSE Prop 00133396 DICOSE Finc 081333963
 recibido el 29/07/2013 le comunicamos que:

Enfermos: 42 Muertos: 30 Total en riesgo: 80 Visita al caso: No
 Motivo de consulta: Decúbito

Otros datos:
 Terneros en encierro. Comen silo peck LL y silo peck moha. Sorgo grano húmedo y Nucleo proteico SB500 (Cibeles). Se echan, quedan caldos flácidos y no se pueden parar. El viernes 26/7 caen 5, 7 el sábado, 8 el domingo, 7 el lunes, 7 el martes, 4 el miércoles, 2 el jueves y 1 el viernes 2 de agosto. Toman agua potable normal. El fardo de moha es común en lote de SB500 Cibeles. Enferman también 1 ó 2 veces de otro lote que lo único en común con los terneros es el núcleo proteico que comieron solo 1 día.

RESULTADOS

Necropsia de animales o vísceras: cantidad 1, lugar y fecha de realización: Treinta y Tres 02/08/2013
 Terro recibido vivo el 2/8/13. Clínicamente presenta flaccidez muscular, parálisis de lengua, reflejo palpebral lento o ausente, atrofia de maseteros y deshidratación. A la necropsia la carcasa tiene buen desarrollo muscular y reservas grasas completas. El contenido de los prestómagos está muy digerido y fluido, y en la redécilla hay restos de tierra y pequeñas piedras. No hay lesiones de interés patológico en ninguno de los órganos internos y macroscópicamente el SNC y la médula espinal es normal.

Los hallazgos clínicos y la ausencia de lesiones anatomopatológicas son compatibles con un cuadro de botulismo. Se retiran muestras para histología y sangre y líquido ruminal para confirmar el botulismo.

Frotis de sangre, revisión clínica, otras técnicas: cantidad 1, lugar y fecha de realización: Lab central y regional 29/07/2013
 Contenido ruminal centrifugado tiene un pH de 5,5-6 que descarta intoxicación por urea.

Estudios especiales a expresa solicitud: cantidad 1, lugar y fecha de realización: Montevideo
 Pendiente. Se remite suero a bacteriología (Mdeo) para diagnóstico de botulismo.

Diagnóstico histopatológico - bloques parafina: cantidad 2, lugar y fecha de realización: Treinta y Tres
 En proceso

En suma los resultados son compatibles con: **Botulismo**

Sin más, le saluda atentamente

Dra. Fernando Dutra
 Técnico responsable

Ficha nº 12754 Informe de resultados Página 1 de 1

Fuente: gentileza Dr. Raúl Oyernard, 2013.

21. BIBLIOGRAFÍA

1. Aalvik, B., Sakaguchi, I., Riemann, H. (1973). Detection of Type E Botulinal Toxin in Cultures by Fluorescent-Antibody Microscopy. *Applied Microbiology*, 25(1): 153-154.
2. Baco, R., (2011). Descripción de un caso: Botulismo en Rocha. *Lechuza Roja* 9 (2): 8-9. Disponible en:
[file:///C:/Users/Pia/Downloads/lechuzaraja023%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Pia/Downloads/lechuzaraja023%20(1).pdf).
Fecha de consulta: 01/10/2016.
3. Barlow, R., (1989). Differential diagnosis of bovine neurological disorders. *In Practice*, 11(2): 64-73.
4. Beiers, P., Simmons, G., (1967). Botulism in pigs. *Australian Veterinary Journal*, 43 (7): 270-271.
5. Bekker, J.G., Rossouw, S.D., (1930). A Note on some Conditions in Sheep in the Strandveld of the Bredasdorp. District. 16th Report, Director Veterinary & Service Animal Industries, Union of South África, p: 298-800.
6. Bennetts, H.W., (1928). Carrion poisoning of sheep (botulism). *Australian Veterinary Journal*, 4(3): 105-106.
7. Bermúdez, J., Cobo, A., Lopez, R., Franchi, M., Mederos, A., (1991). Botulismo primer comunicación sobre la detección de toxina botulínica en bovinos en Uruguay, XIX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, 19, 20 y 21 de Junio, p: 10.01-10.5.
8. Bermúdez, J., Cattáneo, M., Baison, M., (2007). Botulismo en patos. V Jornadas Técnicas Facultad de Veterinaria. Montevideo, 5as. : 21 - 23 nov. p: 167-168.
9. Bermúdez, J., Cattáneo, M., Bermúdez, I., Silva R., (2014). Botulismo en bovinos en confinamiento, XLII Jornada Uruguaya de Buiatría, Paysandú, 5,6 y 7 de Junio, p: 252-254.
10. Bermúdez, J., Cattáneo, M., Moller R., Assis R., (2011). Descripción de un caso clínico por *Clostridium botulinum* tipo C en perro. *Veterinaria Argentina* 28 (283) 1-5.
11. Böhnelt, H., Schwagerick, B., Gessler F., (2001). Visceral botulism a new form of bovine *Clostridium botulinum* intoxication. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 48(6): 373-383.
12. Boroff, D., Schu-Chen, G., 1973. Radioimmunoassay for type A toxin of *Cl. Botulinum*. *Applied Microbiology*. 25: 545-549.

13. Braun, U., Feige, K., Schweizer, G., Pospischill, A. (2005). Clinical findings and treatment of 30 cattle with botulism. *Veterinary Record*: 156(14): 438-441.
14. Bruchim, Y., Steinman, A., Markovitz, M., (2006). Toxicological, bacteriological and serological diagnosis of botulism in a dog. *Veterinary Record*. 158 (22): 768- 769.
15. Carloni, G., (2007). Clostridium. En: Stanchi, N.O. *Microbiología Veterinaria*. Buenos Aires. Intermédica, p: 347-355.
16. Carter G.R., (1969). Clostridios. En: Carter G.R *Procedimientos de diagnóstico en bacteriología y micología veterinaria*. Zaragoza. Acribia. P: 64-67.
17. Cattaneo, M., Bermúdez, J., (2006). Disponible en: http://www.santaelena.com.uy/uc_86_1.html . Fecha de consulta: 05 de mayo de 2016.
18. Casaux G., Formento P., Fiorito M. (2013). *Marco legal del Bienestar Animal en el Uruguay*. 3a ed Montevideo. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. 55 p.
19. Cattáneo, M., Bermúdez, J., Duran, E., Baison, M., Meriño, I., Carvalho Filho, M. B., Assis, R. A. (2009). Botulismo por Clostridium botulinum tipo C En patos En Uruguay. *Analecta Veterinaria*, 29 (1): 25-27.
20. Cattáneo, M., Bermúdez, J., Moller, R., Assis, R. (2016). Descripción de un caso clínico por Clostridium botulinum tipo C en perro. *Veterinaria*, 33(338): 1852-317.
21. Cerrato, R. Valle, J., (2002). Género Colestridium. En: Vadillo Machota, S; Píriz Durán, S; Mateos Yanes, M. *Manual de microbiología veterinaria*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana, p: 467-476.
22. Colbachini, L; Schocken-Iturrino, RP; Marquez, LC., (1999). Intoxicação experimental de bovinos com toxina botulínica tipo D. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 51(3):229-234.
23. CONEAT, (2016). MGAP. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección Nacional de Recursos Naturales. Disponible en: <http://web.renare.gub.uy/js/visores/coneat/>. Fecha de consulta: 1/9/2016.
24. da Costa, G., Salvador S., Pereira M. (2008). Botulismo em bovinos leiteiros no Sul de Minas Gerais, Brasil. *Ciência Rural*; 38(7): 2068-2071.
25. De Freitas., (1987). I-Enfermedades causadas por bacterias. En: Bonino Morlán, Durán del Campo, Mari. *Enfermedades de los lanares*, V. 2, p. 11-55.

26. CO.N.E.A.T. (2016). MGAP. Descripción de Grupos de Suelos Disponible en: <http://www.cebra.com.uy/renare/media/Descripci%C3%B3n-de-Grupos-de-Suelos-CONEAT-1.pdf>. Fecha de consulta: 01 de septiembre de 2016.
27. Dirksen, G., Gründer, H. D., Stöber, M., (2005). Medicina interna y cirugía del bovino. Buenos Aires, Inter-Médica, v 2.
28. Divers, T., Bartholomew, R., Messick, J., Whitlock R., Sweeney, R., (1986). Clostridium botulinum type B toxicosis in a herd of cattle and a group of mules. Journal of the American Veterinary Medical Association, 188(4): 382-386.
29. Doutre, M. P., (1967). 1st case of beta C botulism in swine in Senegal. Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 20(2): 351.
30. Draghi, M., (2000). Botulismo Bovino. Disponible en: http://www.produccion-nimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/intoxicaciones/17-botulismo.pdf. Fecha de consulta:10/05/2016
31. Dutra, I. S., Döbereiner, J., Rosa, Ivan, V., Souza, LAA., Nonato, M., (1993). Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela Técnica de Microfixação de Complemento. Pesquisa Veterinária Brasileira, 13(3/4): 83-86.
32. Dutra, I., (2001). Surtos de botulismo en bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. Pesquisa Veterinária Brasileira, 21 (2): 43-48.
33. Dutra, I., (2005). Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. Pesquisa Veterinária Brasileira, 25(2): 115-119.
34. Enfermedades Clostridiales. Disponible en: http://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R135/R_135_48.pdf. Fecha de consulta: 25/06/2016.
35. Faraon, A., Tourrucôo, A., (2007). Botulismo en canino: caso clínico V Jornadas Técnicas Facultad de Veterinaria, 5as. : 21 - 23 nov. Montevideo, p 168.
36. Forero, G. A. (2007). Botulismo. Revista Electrónica de Veterinaria, 8(4): 1-5.
37. Freeman B. A., (1986). Bacteriología médica. En: Freeman B. A.. Microbiología Burrows. Madrid. Interamericana. 650-655p.
38. Gerber, V., Straub, R., Frey, J. (2006). Equine botulism and acute pasture myodystrophy: new soil-borne emerging diseases in Switzerland? Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 148(10): 553-559.

39. Gil Turnes, C., (1976). Clostridiosis de importancia económica en los bovinos. IV Jornada Uruguaya de Buiatría, Paysandú, 6-18 junio. p 15-16.
40. Gregory, A.R.; Ellis,T.M.; Jubb,T.F.; Nickels, R.J. Cousins, D.V. (1996). Use of enzyme-linked immunoassays for antibody to types C and D botulinum toxins for investigations of botulism in cattle. Australian Veterinary Journal 73: 55-61.
41. Hatheway, C. L. (1988). Botulism. Balows, A., Hausler, W.J.J., Ohashi, M., Turano, A. En: Laboratory diagnosis of infectious diseases. New York. Springer, P 111-133.
42. Heider, L.H., McClure J.T., Leger E.R., (2011). Presuntive diagnosis of Clostridium botulinum type D intoxication in a herd of feedlot cattle. The Canadian Veterinary Journal. 42(3): 210-212.
43. Heidrich H, Gruner J., (1976). Enfermedades infecciosas. En: Heidrich H, Gruner J, Noldner H, Wendt K. Compendio de las enfermedades de los bovinos. Manual de Patología bovina. Zaragoza. Acribia.p. 220-221.
44. Jones T., (1991). Bovine botulism. In Practice, 13(3): 83-86.
45. Jones, T., (2000). Botulismo Bovino. En: Melling M., Alder M., Manual Para la Práctica Veterinaria: Practica bovina 2, Buenos Aires, Intermédica, p: 133-144.
46. Kautter, D., Lynt, R., Solomon, H., Lillt, T., Harmon, S., (1968). La Detección, Identificación, Y Aislamiento De Clostridium Botulinum. En: Kautter, D., Lynt, R., Solomon, H., Lillt, T., Harmon, S. Toxic Microorganisms: Mycotoxins-Botulism, Miendel Herzberg .Washington, U.S. government printing office, p: 236-245.
47. Kummel, j., Krametter-Froetscher, R., Six G., Brunthaler, R., Baumgartner, W., Altenbrunner-Martinek, B., (2012). Descriptive study of botulism in an Austrian dairy herd: a case report. Veterinarni Medicina Czech, 57: 143-149.
48. Leaniz, R., Pasini, M., (1987). Botulismo Animal. INTA Boletín Técnico N°: 10: 1-14.
49. Leaniz, R., Calvo, A., (2003). Boletín Técnico: Botulismo Animal. Disponible en:
http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/intoxicaciones/82-botulismo.pdf .
 Fecha de consulta: 01/10/2016.
50. Lisboa, J., Kuchembuck M., Dutra I., Goncalves R., Almeida C., Barrios I., (1996). Epidemiologia e quadro clínico do botulismo epizoótico dos

bovinos no estado de Sao Paulo. Pesquisa Veterinária Brasileira, 16 (2/3): 67-74p.

51. Madigan, T., Martinko, J., Parker, J., (2004). Biología de los Microorganismos. Madrid, Pearson Educación, 986p.
52. Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., Maguire, D., (2013). *Clostridium* species. En: Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., Maguire, D. Clinical Veterinary Microbiology. Saint-Hyacinthe, Elsevier Health Sciences, p: 215-238.
53. McLoughlin, M. F., McLroy, S. G., Neill, S. D., (1988). A major outbreak of botulism in cattle being fed ensiled poultry litter. The Veterinary Record, 122(24): 579-581.
54. Melling, M, Alder M., (2000). Práctica bovina 2. Buenos Aires, Intermédica, 186 p.
55. Müller, J., (1963). Equine and Bovine Botulism in Denmark. Bulletin Office International des Epizooties, 59 (9-10): 1379-1390.
56. Muller, J., Thomsen, B. F., (1968). An outbreak of type e botulism in west-greenland. Nordisk Veterinær Medicin, 20(9), 479-486.
57. Olate, H. H., Montecino Latorre, D.F., (2008). Botulismo en aves acuáticas silvestres. Tecnología Veterinaria, 14(3): 16- 21.
58. Ortiz, D., Benavides, E., (2002). Epidemiología, diagnóstico y control del botulismo bovino en Colombia. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Efrain_Benavides/publication/239601721_EPIDEMIOLOGIA_DIAGNOSTICO_Y_CONTROL_DEL_BOTULISMO_BOVINO_EN_COLOMBIA/links/0deec5285314ee8140000000.pdf. Fecha de consulta: 22 de abril del 2016.
59. Ortolani, E. L., Brito, L. A., Mori, C. S., Schalch, U., Pacheco, J., Baldacci, L. (1997). Botulism outbreak associated with poultry litter consumption in three Brazilian cattle herds. Veterinary and Human Toxicology, 39(2): 89-92.
60. Pando, J., (1926). Botulismo. Sobre siete casos de muerte de miembros de la familia Schmidt, producidos en Puan. Seminario Medicina, Buenos Aires, V. XXXIII, (4): 1013p.
61. Pino, D., Sánchez A., (2005). Manual de Ganadería Doble Propósito, Enfermedades Clostridiales. Disponible en: [http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online-ganaderia/seccion5/articulo13-s5.pdf](http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion5/articulo13-s5.pdf). Fecha de consulta: 21 de abril de 2016.

62. Popoff, M., Bouvet, P., (2009). Clostridial toxins. *Future Microbiology*. 4:1021-1064.
63. Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., (2000). *Microbiología*. 4a ed. Madrid, Mc Graw-Hill interamericana, p: 191-208.
64. Radostits, O.M., Gay,C.C., Blood, D.C., Hinch, F.W., (2002). *Medicina Veterinaria*, 9a ed, Madrid, Interamericana. V 1.
65. Rebhun, W., (1999). Enfermedades nerviosas. En: Rebhun W., *Enfermedades del ganado vacuno lechero*. Zaragoza, Acribia, p: 527-574.
66. Riet-Correa, F., Gevehr Fernandes, C., (2002). Botulismo en bovinos en Rio Grande del Sur y Uruguay, XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, 12, 13, 14 y 15 de junio, p: 7-10.
67. Rings, D., (2004). Clostridial disease associated with neurologic signs: tetanus, botulism, and enterotoxemia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(2): 379-391.
68. Robles, C., (1998). Enfermedades clostridiales del ganado. Disponible en: http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciones/comun_varias_especies/29-clostridiales.pdf. Fecha de consulta: 27 de noviembre de 2015.
69. Robles, C., Uzal F., Olaechea F., (1993). Guía Práctica de muestreo para el diagnostico en ovinos y caprinos, INTA, Bariloche. P 33.
70. Rodrigues, D., (1995). Doencas causadas por bacterias preocupam técnicos e criadores. *Campo y laborá*. P: 1-3.
71. Romero, G., Hernández, F., Rodríguez, E. (1995). Ultraestructura de las esporas de *Clostridium Botulinum B* y *Clostridium Sporogenes*. *Revista Costarricense Ciencia Médica*, 16(4): 27-31.
72. Senturk, S., Cihan, H., (2007). Brote de Botulismo en un rebaño lechero en Turquía. *Irish Veterinary Journal*; 60(8):481-484. Disponible en: "http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=26370335&lang=es&site=eds-live". Fecha de consulta: 05 de mayo de 2016.
73. Smith, M. O., George, L.W .Enfermedades del Sistema Nervioso. En: Smith B. P., (2010). *Medicina interna de grandes animales*. Barcelona. Elsevier. P 1097-1101.
74. Smith, L. D. (1980). Botulismo, el microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Zaragoza, Acribia, 214 p.
75. Smith, L., Holdeman, L.V., (1968). *The pathogenic anaerobic bacteria*. Illinois. C.C. Thomas, 423p.

76. Simmons, G., Tammemagi, L., (1964). Clostridium botulinum type D as a cause of bovine botulism in Queensland. Australian Veterinary Journal, 40 (4): 123-127.
77. Steinman, A., Chaffer, M., Elad, D., & Shpigel, N. Y. (2006). 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, 13(8): 862-868.
78. Sterne, M.; Batty, I., (1978). Clostridios patógenos. Zaragoza. Acribia. 159 p.
79. Szyfres, B., Trenchi, H., Abaracón, D., (1949). Intoxicación botulínica en patos. Revista de Medicina Veterinaria, 6 (44): 818- 824.
80. Thomas, R., 1991. Detection of Cl. Botulinum types C and D toxin by ELISA, Australian Veterinary Journal 68 (3): 111-113.
81. Tokarnia, C.H.,Langenenegger, C.H.,Carvalho, F.V. (1970). Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil,Pesquisa Agropecuária Brasileira. 5:465-472.
82. Trenchi, H., Szyfres, B.,Abaracón, D., (1948). Intoxicacion botulinica en patos. Montevideo, Revista de Medicina Veterinara, volumen: 818-824.
83. Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Ganaderos. Resolución N° 118/012, Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Resoluciones/RES%20N%C2%B0%20118%2031_07%20CAMPOS%20DE%20RECR%C3%8DA%20Registro%20en%20Divisi%C3%B3n%20Sanidad%20Animal.pdf. Fecha de consulta: 04/12/09/2016. Fecha de consulta: 12 de setiembre de 2016.
84. Uzal, F., (2008). Enfermedades clostridiales de los rumiantes. Disponible en: http://www.santaelena.com.uy/uc_48_1.html. Fecha de consulta: 02/07/2016.
85. Uzal, F., (2013). Enfermedades clostridiales de los rumiantes, con especial énfasis en bovinos. Parte 2: Enfermedades histotóxicas y neurotóxicas. XLI Jornadas de Buiatría del Uruguay; Paysandú, Uruguay p. 68.
86. Willey J. M., Sherwood L. M., Woolverton C. J., (2011). Enfermedades humanas causadas por bacterias En: Willey J. M., Sherwood L. M., Woolverton C. J. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. Madrid, McGraw Interamericana.1124 p.
87. Wilson, W.D; Pusterla, N., (2010). Uso de agentes biológicos en la prevención de enfermedades infecciosas. En: Smith B. P., (2010). Medicina interna de grandes animales. Barcelona. Elsevier. 1557-1622p.

88. Wollanke, B. (2004). Botulism in 16 horses and ponies. *Praktische Tierarzt-Hannover-*, 85(4): 252-261.
89. Zurbriggen, M., Soni, C., Draghi, M., Homse, C., Baez, R., Rochinotti, D., Cardona, G., Somma de Fere, G., Laphitz, E., Vanzini, V., (1986). Prevención del Mal de Aguaype con toxoide Nacional. INTA. Informe del plan de trabajo N° 27/2684 Veterinaria Argentina V. 3 (28):751-755.