

## BOTULISMO

### PRIMERA COMUNICACION SOBRE LA DETECCION DE TOKINA BOTULINICA EN BOVINOS, EN URUGUAY

1 J. Bermudez  
2 A. Cobo  
3 R. Lopez  
4 M. Franchi  
5 A. Mederos

#### RESUMEN

Junto a datos clínicos y epidemiológicos se detecta la presencia de Toxina Botulínica en el contenido intestinal proveniente de una animal muerto.

La detección se realizó en animales de laboratorio (ratones blancos adultos) inoculados por vía intraperitoneal, donde se observa una sintomatología típica y posterior muerte de los mismos dentro de las 24 y 48 horas. La eliminación del efecto patogénico, se llevó a cabo por dos técnicas: a) por inactivación de la Toxina a 100°C durante 10'; determinándose así, la termolabilidad de la misma, frente a controles sin inactivar; y b) por seroneutralización con antitoxina C y D, quedando los ratones protegidos frente a controles sin antitoxina.

#### INTRODUCCION

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*, conociéndose siete tipos toxigenicamente diferentes (A - B - C - D - E - F - G) de los cuales solamente, los tipos C y D revisten mayor importancia en los animales (6 - 8).

Si bien esta es la forma principal de presentación de la enfermedad, se han descrito en potrillos, aves y niños casos de toxiinfección debido a la proliferación de *Cl. botulinum* tanto en intestino como en heridas, generando toxinas que al absorberse producen la enfermedad (6-10-11-12).

- 1.- Profesor de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Veterinaria, Montevideo.
- 2.- Coordinadora del Departamento Técnico de Lab. Santa Elena S.A.
- 3.- Veterinario Clínico responsables del caso.
- 4.- Técnico del CIVET M.C.Rubino Laboratorio Regional de Tacuarembó.
- 5.- Técnico del CIVET M.C.Rubino Laboratorio Regional de Tacuarembó.

c.c.10. 1

La enfermedad se caracteriza, por una parálisis progresiva de los miembros torax, cuello y garganta. La muerte puede aparecer rápidamente o pueden permanecer enfermos por varios días, hasta quedar en posición decubito y luego morir. (1-6-8)

Se hace notar que los animales no presentan lesiones características al examen post mortem, presentándose gran cantidad de cuerpos extraños en el rumen, retículo y abomaso. (1-3-12).

En los bovinos esta afección se presenta en regiones con alta carencia de fósforo, llevando esto a la osteofagia, la cual resulta ser la principal vía directa de diseminación de la enfermedad. Esta alteración del apetito se manifiesta principalmente en animales con mayores requerimientos, por lo que la mayor incidencia se da en hembras en gestación y lactancia, dando una manifestación estacional de la enfermedad. (1-4-7-12).

Esta enfermedad en los bovinos reviste una gran importancia económica habiendo sido descrita en Sud Africa (Lambsieke) como responsable de la muerte de cincuenta mil animales por año (9), en Australia (Mystery disease) (7), EEUU (Forrage poisoning) (6). Inglaterra, Argentina, (Mal del Aguapey) (12), y Brasil (Doença de Maodura) (3).

El objetivo de este trabajo fue determinar la etiología de una importante mortandad de bovinos cruce Cebu que persiste desde hace años en la zona del arroyo Clara del Dpto. de Tacuarembó.

**PERFIL DEL ESTABLECIMIENTO**

El estudio se realizó en el establecimiento Los Brahman S.G. ubicado en la localidad de Clara, ----- 9a. Secc. Policial de Tacuarembó, que posee una superficie de 6072 Ha. con un índice Coneat promedio de 78. El establecimiento esta orientado a la producción de carne mediante cruces cebuinas, habiéndose importado reproductores Brahman puro desde Argentina al comienzo de la explotación, y actualmente el total de bovinos asciende a 5.400 cabezas. Las pariciones se concentran en primavera y otoño, llegando a tasas de procreo de un 85% en vaquillonas y un 41% en vacas de cría.

También hay lanares siendo un rubro secundario en el establecimiento. Tanto en el establecimiento como en la zona se detectan casos clínicos de hipofosforos, con problemas de infertilidad y es una constante en la región la presencia de pica y osteofagia. El suelo de la región es de tipo arcilloso lo que hace los niveles de fósforo en las pasturas sea bajo. No existen reservas forrajeras en el establecimiento y sólo se suplementan los animales del plantel. distribuyéndose sal con harinas de huesos.

Antecedentes y descripción del brote

A partir de los meses de febrero a abril de 1989 coincidiendo con una gran sequía se registran 30 muertes de animales de un total de 300 vacas de cría, habiéndose observado una sintomatología clínica de incoordinación, temblores musculares, dificultad respiratorio, con postración y muerte. Los resultados de la necropsia daban un diagnóstico presuntivo de enfermedad viral (Diarrea Viral Bovina) Rinotraqueitis infecciosa (Fiebre catarral maligna). Los resultados del Laboratorio Rubino Central evidenciaron títulos de 1/8 a la seroneutralización de I.B.R. y los estudios histopatológicos no permitieron precisar un diagnóstico etiológico. Los análisis bioquímicos mostraron niveles de fosfatemia de 2.6 mg. por ciento, valores muy inferiores al rango normal.

En el año 1991 durante la misma época se vuelven a registrar muertes de 29 vacas, constatándose una morbilidad del 10% con 100% de letalidad, encontrándose las muertes limitadas a un sólo potrero. No se observaron casos clínicos en lanares ni equinos, pero se han constatado muertes en fiandues en el mismo potrero.

### Sintomatología clínica y hallazgos de necropsia

Las vacas en su mayoría con cría al pie, presentan al comienzo debilidad del tren posterior y terminan en decubito external y luego lateral. El síntoma más característico que permite detectar precozmente los animales afectados se presenta al mover al rodeo durante un buen rato y en distancias relativamente largas, los enfermos comienzan a quedar rezagados.

Las vacas Cebú, normalmente ágiles y activas se muestran algunas con sensorio normal pero lentas de movimiento y no ofrecen resistencias al ser enlazadas, en otras se observa cierta depresión del sensorio, mientras que algunas en cambio, permanecen decubito manifestando una actitud de alerta arrastrándose por medio de sus miembros anteriores.

SE observa a nivel del rodeo osteofagia y es frecuente ver a los animales rodeando los cadáveres y lamiéndolos, destacándose el gran pisoteo del suelo alrededor de los cadáveres. En ningún caso se observó hipertemia como tampoco diarrea, habiéndose observado en algunos pocos casos pérdida de sensibilidad cutánea en el tren posterior, permitiendo la fácil movilización de los miembros sin ofrecer resistencia alguna.

Otro síntoma característico que encontramos en casi todas las vacas afectadas, es la flacidez de lengua, la cual se puede retirar con extrema facilidad, y al cesar la tracción permanece fuera colgante, habiéndose encontrado hipotimía general y del esfínter con contispación.

El curso de la enfermedad es variable permaneciendo algunos de los animales enfermos hasta veinte días y otros mueren a los tres o cuatro días después del comienzo de los signos clínicos.

A la necropsia se vio líquido en la cavidad abdominal, ganglios mesentéricos aumentados, congestión intestinal, cuajo hemorrágico, hígado congestivo con aumento de tamaño y petequias en el endocardio. Es constante el hallazgo de cuerpos extraños en retículo, rumen y caujo, tales como piedras, huesos, cucharas de agua, como también larvas de moscas (?) lo que asocia casi seguramente a lo observado en los animales de rodear y lamer los cadáveres.

### Patología clínica

Se remitió material consistente en sangre de cuatro animales sanos y dos enfermos para la dosificación de calcio, fósforo y magnesio, así como proteínas plasmáticas apareciendo una severa hipofosfatemia en todas ellas. Al momento de la necropsia se glucosa en orina evidenciando uno de ellos, glucosuria.

De acuerdo a la sintomatología clínica los hallazgos de necropsia, y estos antecedentes, el profesional actuante realiza un diagnóstico presuntivo de intoxicación por toxinas de Cl. Botulinum, remitiendo material al laboratorio con dicha presunción. El material remitido consistió en trozos de hígado, bazo, cerebro y contenido de rumen, redécilla, librillo, intestino, así como sangre.

### Procesamiento en el laboratorio

En el laboratorio los materiales fueron conservados a 4°C mientras que se realizaron los estudios toxicológicos y microbiológicos tendientes a la identificación de toxinas botulínicas.

### Estudios toxicológicos

Las muestras se trituraron en un mortero con el agregado de un buffer de gelatina (8) obteniéndose una suspensión homogénea que se dejó por 18 horas a 4°C. Posteriormente se clarificó por centrifugación a 3.000 G. y se filtró por membrana esterilizante Millipore de 0.22 micra, inoculándose 2 ratones blancos adultos por vía intraperitoneal con 0.5 ml. de cada muestra. Los ratones inoculados fueron observados durante 10 días registrándose diariamente síntomas clínicos y muertes, dejándose en todos los casos animales sin inocular. Los materiales que provocaron síntomas y muerte, se les inactivó por el calor a 1.00 C durante 10 minutos y se seroneutralizaron con Antitoxina butulínica tipo C y D.

### Inactivación por el calor

Se tomaron las muestra en recipientes estériles y se inactivaron durante 10 minutos, inoculándose luego 2 ratones con 0.5 ml. por vía intraperitoneal; paralelamente se inoculan 2 ratones con el mismo material sin inactivar, el que actuó como control de prueba.

### Seroneutralización

Se usaron sueros antibotulinicosos monovaleantes de los tipos C. y D. del Veterinary Research Institute, Onderstepoort, de Sud Africa. Los sueros se diluyeron hasta un nivel de 10 U.I. y se enfrentaron en los volúmenes de 0.1 ml. con 0.5 ml. de la muestra, dejándose en incubación a 37°C durante 60 minutos. Luego se inocularon ratones con 0.6 ml. por vía intraperitoneal junto a muestras controles sin neutralizar. En los casos de protección cruzada de los tipos C. y D se hicieron (hizo seroneutralización con niveles de antitoxina de 0.5 y 0.25 U.I.) ( ).

### Estudio microbiológico

De los macerados usados para el estudio de toxinas, se les hizo tratamiento con etanol 97% en partes iguales, dejándolos por una hora a temperatura ambiente, y agitándolo 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, todos se inocularon a 37°C durante 7 días.

Luego de la incubación se realizaron frotis tenidos por el método de Gram, y el sobrenadante fue centrifugado a 3000 G y filtrado por millipore de 0.22 micras, inoculándose 2 ratones con 0,5 ml. por vía intraperitoneal para cada tubo de cultivo.

### Resultados

De todos los materiales estudiados solo la muestra de contenido intestinal de un animal resultó positiva, causando síntomas típicos de botulismo y muerte dentro de las 24 y 48 horas, los ratones inoculados. Dicho efecto patogénico desapareció por la inactivación a 100°C por 10 minutos y por la neutralización con antitoxina C. y D. en el nivel de 1 U.I.

En la seroneutralización con niveles de 0.5 U.I. de antitoxina, solo hubo protección con el tipo D. y en el nivel 0.52 U.I. no hubo protección con los 2 tipos de antitoxina.

En todos los casos los controles del contenido intestinal sin inactivar y neutralizar, presentan síntomas y murieron dentro de las 24 horas. En los estudios microbiológicos, todos los cultivos fueron negativos a la inoculación intraperitoneal en ratones, por lo que no se realizaron estudios posteriores.

### Discusión y conclusiones

El botulismo es una enfermedad que ha sido reconocido en varios países con importante producción ganadera, presentándose como denominador común en áreas con (importante) carencia de fósforo en las pasturas (1-4-7 y 12).

En el presente trabajo, los antecedentes descriptos, la presentación estacional de la enfermedad en zonas con elevada carencia de fósforo, así como la Sintomatología descrita, dan bases sólidas para el diagnóstico presuntivo de intoxicación por toxina botulinum, presentaciones similares de esta enfermedad se dan en países como Sud Africa, Australia, Argentina y Brasil (2-3 y 4).

Los hallazgos de laboratorio confirman el diagnóstico con la detección de toxina botulínica en el contenido intestinal de uno de los animales, lo que demuestra además la ingestión de la misma.

Las pruebas de seroneutralización indican la presencia de toxina tipo D. como se ha demostrado en casos similares en Sud Africa y Australia (4-7-8 y 9).

Lo anteriormente descrito lleva a confirmar el primer diagnóstico de intoxicación por toxina botulínica en bovinos del Uruguay.

Por lo que nos permitimos sugerir que sería de importancia hacer estudios epidemiológicos en dicha zona, con la finalidad de adoptar criterios de control basado en la inmunoprofilaxis, suplementación con fósforo, y eliminación de los cadáveres como segura fuente de diseminación de la enfermedad.

El trabajo de laboratorio fue realizado en el Departamento Técnico de Laboratorio Santa Elena.

#### SUMMARY

Together with clinical sign and epidemiological data the presence of botulinum toxin is detected in the intestinal contents of a dead animal.

Detection was performed on laboratory animals (adult white mice) by intraperitoneal route, and the typical symptomatology and later death of them within 24 to 48 hours was observed.

Pathogenic effect elimination through boiling (100°C during 10 minutes determining in this way its thermosensitivity in front of controls without inactivation.

By seroneutralization with, and antitoxins, remaining mice protected with controls without anti toxin.

#### BIBLIOGRAFIA

- BLOO, D.C., Radositis, O.H. Henderson, J.A.; Veterinary Medicine 6a. th. Ed. London; Bailliere Tindall, 1983, 539-540.
- CRAVEN, C.P., Aust. Vet. J. 1964, 40: 127-130.
- HUBINGER TOCARNIA, C. et al. Pesq. Agrop. Bras. 1970. 5: 465-472.
- MOSAR, J.H. et al S.A.V.M.A., IX: 65-70.
- SAKAGUCHI, G.. Univ. of Osaka Prefecture, College of Agriculture. Sakai Shi, Osaka 591. Japan.
- SMITH. L.D. HOLDEMAN. L.V., The pathogenic Anaerobic Bacteria, Springfield, Charles L. Thomas. Chapter 12:283-313.
- SIMMONS, G.C., TAMMENDAGHI, L. Aust. Vet. J. 1964, 40:123-127.
- STERNE, M. BATTY, I. Pathogenic Clostridia, - Butterworths. 1975.
- STERNE. M. WENTZEL, L.M. Jour of Immun 1950, 65: 173-183.
- SUGIYAMA, H. Rev. infect. Dis., 1979, I: 683-687.
- DUGIYAMA, H. Microbiological Review, 1980, 4: 419-448.
- ZURHIGEN, C.P., et al Vet. Arg. 1986, 28: 751-755.

#### AGRADECIMIENTOS

Al ayudante técnico José Luis Cobo quien llevó a cabo los técnicos de laboratorio y a Gabriel Del Campo y Gustavo Ungo por la compaginación del presente trabajo.