

DIAGNÓSTICO DO BOTULISMO EM BOVINOS NO BRASIL PELA TÉCNICA DE MICROFIXAÇÃO DE COMPLEMENTO¹

IVERALDO S. DUTRA², HANS-ERICH WEISS³, HANNELORE WEISS⁴ e JÜRGEN DÖBEREINER⁵

ABSTRACT.- Dutra I.S., Weiss H.-E., Weiss H. & Döbereiner J. 1993. [Diagnosis of botulism of cattle in Brazil by micro-complement fixation.] Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(3/4):83-86. Depto Med. Veterinária, FOA, Unesp-Campus de Araçatuba, C.P. 533, Araçatuba, SP 16015-050, Brazil.

The heat induced micro-complement-fixation test was used for the laboratory diagnosis of botulism in cattle. The following specimens were collected in southeastern and central-western Brazil: Thirty six samples of blood serum, liver and rumen liquid from 23 bovines with clinical signs of botulism (a condition commonly called "doença da vaca caída" - fallen cow disease) and from 1 bovine inoculated subcutaneously with botulinum type C toxin. Samples of blood serum, liver and rumen liquid collected from healthy bovines were used as negative controls. Sixteen out of 17 serum samples were positive for botulinum toxin in cattle with clinical signs of acute, subacute and chronic botulism. All 9 liver samples were positive including those from chronic cases. Two samples of rumen liquid from bovines with the acute disease gave a positive test, but 2 other chronic cases were negative. All 3 samples collected from the bovine with subacute clinical signs gave positive results. From 36 samples examined, 31 were positive; of these 2 were of type C, 5 type D and 24 samples had to be grouped within the CD complex. All samples gave negative results with the mouse bioassay, including the material collected from the experimental case. In conclusion at least one sample of each of the 24 cases examined gave a positive result for botulinum toxin; thus this highly sensitive test confirmed the diagnosis that the "doença da vaca caída" is indeed botulism, caused by type C and D toxins.

INDEX TERMS: Heat induced micro-complement-fixation test, botulism, botulinum type C and D toxins, laboratory diagnosis, "doença da vaca caída", cattle, Brazil.

SINOPSE.- Foi utilizada a técnica de Microfixação de Complemento Induzida pelo Aquecimento para o diagnóstico laboratorial do botulismo em bovinos. Neste sentido foram colhidas, nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, 36 amostras constituídas por soro sanguíneo, fígado e líquido ruminal de 23 bovinos com quadro clínico de botulismo, vulgarmente conhecido como "doença da vaca caída", e de 1 bovino intoxicado experimentalmente pela toxina botulínica tipo C. Como controle negativo foram utilizados soro sanguíneo, fígado e líquido ruminal de bovinos sadios. De 17 soros examinados de bovinos com quadros clínicos agudo, subagudo e crônico, 16 foram positivos para a presença de toxina; todas as 9 amostras de fígado também foram positivas, mesmo de animais com intoxicação crônica. Duas amostras de líquido ruminal de bovinos com doença aguda foram positivas no teste, enquanto 2 amostras colhidas de animais com

evolução crônica foram negativas. As 3 amostras oriundas do bovino intoxicado experimentalmente e apresentando evolução subaguda, foram positivas na Microfixação. Das 36 amostras examinadas, 31 foram positivas no teste, sendo 2 pertencentes ao tipo C, 5 ao tipo D, e 24 agrupadas dentro do complexo CD. Todas essas amostras foram negativas no Bioensaio em camundongo, inclusive o material colhido do bovino intoxicado experimentalmente. Com base nos resultados, e tendo como referência o Bioensaio em camundongo, a Microfixação de Complemento demonstrou um excelente desempenho, permitindo o diagnóstico laboratorial de botulismo em pelo menos um material de cada um dos 24 casos examinados, confirmando assim o diagnóstico de que a "doença da vaca caída" é de fato botulismo causado pelas toxinas C e D.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Técnica de Microfixação de Complemento Induzida pelo Aquecimento, botulismo, toxinas botulínicas tipos C e D, diagnóstico laboratorial, "doença da vaca caída", bovinos, Brasil.

INTRODUÇÃO

O botulismo é uma importante causa de mortalidade de bovinos adultos no Brasil (Döbereiner et al. 1992). O diagnóstico da doença, vulgarmente denominada "doença

¹ Aceito para publicação em 26 de maio de 1993.

² Departamento de Medicina Veterinária, FOA, Unesp-Campus de Araçatuba, Caixa Postal 533, Araçatuba, SP 16015-050; bolsista CNPq 305967/85-1).

³ Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Heidelberg, Czernyring 2a/b, D-6900 Heidelberg 1, RFA.

⁴ Dreikreuzweg 4, D-6903 Neckargemünd, RFA.

⁵ Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 3851-970; bolsista CNPq (305294/88-1).

da vaca caída” tem sido estabelecido pela sintomatologia, ausência de lesões específicas, histórico e quadro epidemiológico. Laboratorialmente o diagnóstico é feito através da inoculação em camundongo de extrato hepático, soro sanguíneo ou conteúdo intestinal e ruminal de animais suspeitos e pela observação dos sinais da intoxicação; a confirmação ocorre quando a toxina presente no material testado é neutralizada pela antitoxina botulínica específica. Este procedimento é efetivo no diagnóstico do botulismo em aves, mas na maioria das vezes negativo quando utilizado em material proveniente de bovinos intoxicados.

O desenvolvimento e utilização de técnicas “in vitro” têm sido descritos, mas geralmente apresentam sensibilidade menor que a inoculação em camundongo (Smith 1977, Shone et al. 1985, Silva et al. 1991, Thomas 1991). Weiss & Weiss (1988) utilizaram a técnica de Microfixação de Complemento Induzida pelo Aquecimento no diagnóstico do botulismo em aves e verificaram uma sensibilidade 40 vezes superior que o Bioensaio em camundongo. Numa aplicação subsequente da técnica para o diagnóstico do botulismo em bovinos na Alemanha, Weiss et al. (1990) obtiveram resultados positivos em diferentes materiais biológicos.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar os resultados da utilização da Microfixação de Complemento no diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil, testando-se materiais colhidos em surtos da doença e de um caso experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita e preparo do material

Foram colhidas 36 amostras constituídas por soro sanguíneo (20), fígado (11) e líquido ruminal (5) de 23 bovinos com diagnóstico clínico de botulismo (“doença da vaca caída”), apresentando evoluções clínicas aguda, subaguda e crônica e de 1 caso subagudo de intoxicação experimental em bovino pela inoculação subcutânea de toxina botulínica tipo C, obtida de cepa de campo de *Clostridium botulinum*. As amostras foram colhidas logo no início da abordagem clínica (soro sanguíneo) ou quando da necropsia dos animais, transportadas sob refrigeração e conservadas a -20°C .

O preparo do material para realização da técnica foi de acordo com Weiss & Weiss (1988). Os soros sanguíneos foram centrifugados duas vezes a 3.000 rpm e filtrados em membrana de $0,25\ \mu\text{m}$. Após a filtração, alíquotas dos mesmos foram diluídas em tampão Veronal, pH 7,5, e aquecidas em banho-maria por 30 minutos a 56°C , para inativação do próprio complemento. As amostras de fígado foram maceradas com auxílio de areia estéril, diluídas 1:2 em tampão Veronal e o período de extração da toxina foi de no mínimo 1 hora; a inativação do complemento foi realizada como descrita para o soro. O processamento das amostras de líquido ruminal obedeceu os mesmos critérios. Os materiais assim preparados foram considerados antígenos prontos para uso.

Controle negativo

Para utilização como controle negativo na Microfixação de Complemento foram colhidas 5 amostras de soro sanguíneo, 4 de

fígado e 3 de líquido ruminal de bovinos sadios, abatidos em matadouro. Os mesmos procedimentos citados acima na conservação e preparo dos materiais suspeitos foram adotados.

Bioensaio em camundongo

Para realização do teste em camundongo as amostras de fígado colhidas foram maceradas, diluídas 1:2 em tampão gelatina-fosfato com pH 7,2, centrifugadas e passadas em filtro de Seitz. As amostras de soro sanguíneo e líquido ruminal foram centrifugadas, filtradas e utilizadas sem qualquer diluição. O período de observação dos camundongos foi de 4 dias a partir da inoculação de 0,5 ml do material via intraperitoneal.

Toxinas e antitoxinas botulínicas C e D

As toxinas botulínicas C e D utilizadas foram obtidas de cepas de *C. botulinum* homólogas, cultivadas em meio de cultura de Wright, com atividades biológicas de $3,2 \times 10^4$ DL₅₀/ml e $1,7 \times 10^4$ DL₅₀/ml, respectivamente, determinadas em camundongo. Para utilização como controle positivo no teste as toxinas foram diluídas 1:5 em tampão Veronal. As antitoxinas botulínicas C e D foram cedidas gentilmente pelo Instituto Pasteur de Paris, França, e “Statens Serum Institut” de Copenhagen, Dinamarca, respectivamente, e preparadas para uso no teste através da diluição 1:5 em tampão Veronal.

Microfixação de Complemento

Foi usada a técnica de Fixação de Complemento Induzida pelo Aquecimento, realizada em microplaca, denominada aqui Microfixação de Complemento, descrita por Weiss & Weiss (1988).

Componentes do sistema hemolítico e complemento. Hemácia de carneiro, hemolisina anti-hemácia de carneiro (Amboceptor) e complemento de cobaia (Behringwerk, Marburg, Alemanha) foram preparados de acordo com Weiss & Weiss (1988). Para utilização no sistema hemolítico 15 ml de eritrócitos a 1,5% foram diluídos em 28 ml de tampão Veronal e acrescidos de 1 ml de amboceptor.

Determinação da concentração de complemento. Para cada antígeno testado, incluindo-se os controles negativos, foi determinada preliminarmente a concentração de complemento de cobaia a ser utilizada na pesquisa principal. Diluições geométricas de complemento em tampão Veronal, variando de 1:2 a 1:56 foram realizadas em microplacas de 96 poços com fundo em U. Em cada poço correspondente às diluições foram pipetados 25 μl de antígeno pronto para uso. Após a homogeneização em agitador orbital o material foi incubado por 30 minutos a 37°C , seguindo-se a pipetagem de 50 μl do sistema hemolítico em cada poço. Novamente procedeu-se a homogeneização e incubação por mais 30 minutos a 37°C . Em seguida a microplaca foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. Duas concentrações simultâneas de complemento foram escolhidas: uma em que foi vista o primeiro botão de eritrócitos, e a diluição anterior.

Pesquisa principal. A série de poços situados no superior da microplaca com fundo em U foi utilizada para os materiais considerados controles negativos; cada amostra de soro sanguíneo testada teve como controle negativo uma outra amostra constituída também por soro e assim sucessivamente com os outros materiais. Em todos os poços foram pipetados 25 μl de tampão Veronal. Na primeira série, correspondente ao controle negativo foram pipetados 25 μl do material controle. Nas segundas e terceiras séries de poços foram pipetados 25 μl do antígeno pronto para uso. A partir da terceira fileira foi realizada uma diluição geométrica do material com auxílio de um diluidor manual. Em

seguida foram pipetados em todos os poços, inclusive os do material controle, antitoxina botulínica C ou D, simultaneamente em cada microplaca. Para cada material testado foram destinadas duas fileiras verticais correspondente às duas concentrações de complemento determinadas anteriormente; em cada poço foi pipetado 25 μ l de complemento. Logo após procedeu-se a homogeneização com auxílio de agitador orbital e incubação da microplaca por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação foram acrescentados 50 μ l do sistema hemolítico em todos os poços. Seguiu-se nova incubação por 30 minutos a 37°C, precedida também de homogeneização. Em seguida as microplacas foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm, procedendo-se então a leitura. Com base na antitoxina utilizada pode-se estabelecer o tipo de toxina presente no material analisado (antígeno). A reação foi considerada positiva quando os orifícios contendo o material controle apresentaram todas as hemácias lisadas, nas duas concentrações de complemento, e quando em pelo menos uma das concentrações do antígeno testado o botão de eritrócitos esteve presente. Em cada microplaca constou além do controle negativo, o controle positivo, constituído pela toxina botulínica C ou D.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Bioensaio em camundongo é considerado o teste mais específico para o diagnóstico do botulismo, apresentando, no entanto, baixa sensibilidade toxicológica. Isto faz com que numa frequência relativamente alta, materiais provenientes de bovinos suspeitos de intoxicação botulínica apresentem resultados negativos quando inoculados em camundongo (Thomas 1991). O desenvolvimento e emprego de técnicas imunológicas como a Hemaglutinação reversa passiva (Sakagushi et al. 1974), o Radioensaio (Boroff & Schu-Chen 1973), a Imunodifusão (Mestrandrea 1974), a Imunofluorescência (Aalvik et al. 1973) e o teste de ELISA (Noack & Schliesser 1986) para detecção de toxina botulínica não tem contribuído satisfatoriamente para a substituição do Bioensaio, uma vez que possuem sensibilidade menor. Weiss & Weiss (1988) adaptaram o teste de Fixação de Complemento visando o diagnóstico do botulismo em aves, e estabeleceram, através do cálculo de diluições, que a Microfixação de Complemento Induzida pelo Aquecimento seria 40 vezes mais sensível que o Bioensaio. Dentro desta perspectiva foram analisados no presente trabalho 36 materiais provenientes de 23 bovinos com quadro sintomatológico de botulismo e de 1 caso reproduzido experimentalmente em bovino com toxina botulínica tipo C. Os resultados obtidos na análise das amostras de soro sanguíneo de bovinos com intoxicação botulínica aguda, sub-aguda e crônica são apresentados no Quadro 1. De 17 soros sanguíneos examinados, 16 foram positivos na Microfixação de Complemento. A dificuldade ocorreu, no entanto, na determinação do tipo de toxina botulínica presente no material, uma vez que 10 amostras apresentaram reações semelhantes tanto para toxina botulínica tipo C quanto para o tipo D; desta maneira, foram classificadas como pertencentes ao complexo CD. Da mesma forma, os extratos hepáticos examinados foram considerados positivos para o complexo CD, sendo apenas 1 amostra positiva para

Quadro 1. Resultado das amostras de soro bovino suspeitas de conter toxina botulínica, analisadas pelo Bioensaio em camundongo e na Microfixação de Complemento (MFC)

Evolução clínica	Nº de amostras examinadas	Nº de amostras positivas no Bioensaio	Nº de amostras positivas na MFC	Tipos de toxina		
				C	D	CD ^a
Aguda	13	0	13	2	3	8
Subaguda	2	0	2	0	0	2
Crônica	2	0	1 ^b	0	1	0

^a Agrupadas dentro de complexo CD.

^b Amostra colhida no início dos sintomas; o bovino sobreviveu.

Quadro 2. Resultado das amostras de fígado de bovinos com diagnóstico clínico-patológico de botulismo, analisadas pelo Bioensaio em camundongo e na Microfixação de Complemento (MFC)

Evolução clínica	Nº de amostras examinadas	Nº de amostras positivas no Bioensaio	Nº de amostras positivas na MFC	Tipos de toxina		
				C	D	CD ^a
Aguda	6	0	6	0	1	5
Subaguda	2	0	2	0	0	2
Crônica	1	0	1	0	0	1

^a Agrupadas dentro de complexo CD.

toxina botulínica tipo D (Quadro 2). Oguma et al. (1984) demonstraram que as toxinas tipos C e D possuem epítomos comuns e específicos e que alguns epítomos comuns contribuem para a neutralização cruzada observada entre os tipos C e D. Esta característica, associada ao fato da Microfixação de Complemento ser um teste qualitativo, certamente contribui para a dificuldade na determinação exata do tipo de toxina botulínica quando utilizado para análise de materiais de campo.

As amostras de líquido ruminal de bovinos apresentaram resultados positivos quando provenientes de animais com intoxicação botulínica aguda, e negativos quando obtida de animais com quadro crônico (Quadro 3). A detecção de toxina botulínica foi possível em extrato hepático de bovino com evolução crônica, quando necropsiado 12 dias após o início dos sintomas (Quadro 4).

Todos os materiais examinados na Microfixação de Complemento foram negativos no Bioensaio em camundongo. As amostras de toxinas botulínicas tipos C e D utilizadas como controle positivo no teste, foram positivas, matando os camundongos com os sintomas característicos dentro de poucas horas após a inoculação.

Os resultados obtidos no exame dos materiais oriundos do bovino intoxicado experimentalmente são apresenta-

Quadro 3. Resultado das amostras de líquido ruminal de bovinos com diagnóstico clínico-patológico de botulismo, analisadas pelo Bioensaio em camundongo e na Microfixação de Complemento (MFC)

Evolução clínica	Nº de amostras examinadas	Nº de amostras positivas no Bioensaio	Nº de amostras positivas na MFC	Tipos de toxina		
				C	D	CD ^a
Aguda	2	0	2	0	0	2
Crônica	2	0	0	0	0	0

^a Agrupadas dentro do complexo CD.

Quadro 4. Comparação do Bioensaio em camundongo com a Microfixação de Complemento de materiais colhidos de bovino com botulismo de evolução crônica, necropsiado 12 dias após o início dos sintomas

Material examinado	Bioensaio em camundongo	Microfixação	
		C	D
Soro sanguíneo	- ^a	-	-
Fígado	-	+ ^b	+
Líquido ruminal	-	-	-

^a Negativo; ^b Positivo.

Quadro 5. Resultado do Bioensaio em camundongo e da Microfixação de Complemento de materiais colhidos de um bovino com botulismo induzido experimentalmente, com evolução clínica subaguda

Material examinado	Nº de horas da colheita após início dos sintomas	Bioensaio em camundongo	Microfixação	
			C	D
Soro sanguíneo	12	- ^a	+ ^b	+
Soro sanguíneo	72	-	+	+
Fígado	72	-	+	+

^a Negativo; ^b Positivo.

dos no Quadro 5. Da mesma forma que nos materiais examinados acima, o Bioensaio em camundongo foi negativo; na Microfixação de Complemento, no entanto, as amostras de soro sanguíneo e fígado apresentaram reação cruzada para toxinas tipos C e D, sendo portanto considerados positivos.

Os resultados obtidos por Tokarnia et al. (1970) através da detecção de cultivos de *C. botulinum* produtores de toxinas C e D, em diferentes materiais biológicos colhidos no Estado do Piauí durante surtos de botulismo em bovinos, condizem com os achados do presente trabalho, onde foi verificado que realmente as duas toxinas estão envolvidas com surtos da doença no Brasil.

Baseado nos resultados obtidos pela utilização da Microfixação de Complemento em materiais colhidos de bovinos com diagnóstico clínico de botulismo, o teste demonstrou ter uma excelente eficácia na detecção de toxinas C e D, quando utilizado como referência o Bioensaio em camundongo. Pelo menos 1 dos materiais examinados de cada um dos 23 casos naturais da doença foi positivo no teste, confirmando o diagnóstico do botulismo para a "doença da vaca caída".

Agradecimentos. - Aos Drs. Ivan Valadão Rosa e Ivo Cesar Martins, Embrapa-CNPGC, Campo Grande, MS, e ao Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola (IICA), Brasília, DF, por intercederem e possibilitarem a vinda do Dr. H.-E. Weiss ao Brasil. Ao "Staatens Serum Institut" de Copenhagen, Dinamarca, pela cessão de antitoxinas botulínicas, e ao Dr. K. Gessler, Diretor do "Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt" de Heidelberg, República Federal da Alemanha, pelo apoio dado.

REFERÊNCIAS

- Aalvik B., Sakaguchi G. & Riemann H. 1973. Detection of type E botulinum toxin in cultures by fluorescent-antibody microscopy. *Appl. Microbiol.* 25:153-154.
- Boroff D.A. & Schu-Chen G. 1973. Radioimmunoassay for type A toxin of *Clostridium botulinum*. *Appl. Microbiol.* 25:545-549.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H., Langenegger J. & Dutra I.S. 1992. Epizootic Botulism of cattle in Brazil. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 99:188-190.
- MestrAndrea L.W. 1974. Rapid detection of *Clostridium botulinum* toxin by capillary tube diffusion. *Appl. Microbiol.* 27:1017-1022.
- Noack M. & Schliesser T. 1986. Nachweis von *Clostridium botulinum* Toxin unter Verwendung des Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Systems. Tagung der Fachgruppe Bakteriologie der DVG, Schloss Rauschholzhausen bei Marburg, Alemanha, 4-6. Juni, S. 156-160.
- Oguma K., Muryama S., Syuto B., Iida H. & Kubo S. 1984. Analysis of antigenicity of *Clostridium botulinum* type C1, and D toxins by polyclonal and monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 43(2):584-588.
- Sakaguchi G., Sakaguchi S., Kozaki S., Sugii S. & Ohishi I. 1974. Cross reaction in reversed passive hemagglutination between *Clostridium botulinum* type A and B toxins and its avoidance by the use of antitoxin component immunoglobulin isolated by affinity chromatography. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 27:161-172.
- Shone C., Smith P.W., Appleton N., Hambleton P., Modi N., Gatley S. & Melling J. 1985. Monoclonal antibodies-based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is comparable to the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(1):63-67.
- Silva D.A.O., Souza M.A., Henares Beicher A.M.A. Mineo J. R., Ferreira F.A., Coelho H.E., & Bastos J.E.D. 1991. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de toxina botulínica tipo D. *Pesq. Vet. Bras.* 11(1/2):13-16.
- Smith L.D. 1977. Botulismo. El microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Ed. Acribia, Zaragoza (España). 213p.
- Thomas R.J. 1991. Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. *Aust. Vet. J.* 68(3):111-113.
- Tokarnia C.H., Langenegger J., Langenegger C.H. & Carvalho E.V. 1970. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 5:465-472.
- Weiss H.-E. & Weiss H. 1988. Nachweis von *Clostridium botulinum*-Toxin mittels Mikro-Wärme-Komplement-Bindungsreaktion. *Tierärztl. Umschau* 43:117-126.
- Weiss H.-E., Rademacher G., Doll K. & Dirksen G. 1990. Schnelldiagnose des Botulismus beim Rind mittels Mikro-Wärme-Komplement-Bindungsreaktion. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 97:398-400.