

BOTULISMO:

PRIMERA COMUNICACIÓN SOBRE LA DETECCIÓN DE TOXINA BOTULINICA EN BOVINOS, EN EL URUGUAY

Autores:

J. Bemúdez *Profesor de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Veterinaria, Montevideo.*

A. Cobo *Coordinadora del Departamento Técnico de Laboratorios Santa Elena S.A.*

R. Lopez *Veterinario Clínico responsable del caso.*

M. Franchi *Técnico del CIVET M. C. Rubino - Laboratorio Regional de Tacuarembó.*

A. Mederos *Técnico del CIVET M. C. Rubino - Laboratorio Regional de Tacuarembó.*

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 toxigénicamente diferentes (A, B, C, D, E, F, G) de los cuales solo los tipos C y D revisten mayor importancia en los animales (6,8).

Si bien esta es la forma 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).

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

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

En los bovinos esta infección se presenta en regiones con alta carencia de fósforo, llevando esto a la osteofagia, la cual resulta ser la principal vía 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 Sudáfrica (Lambsiekte) como responsable de la muerte de cincuenta mil animales por año (9), en Australia (Mystery disease) (7), en Estados Unidos (Forrage poisoning) (6), Inglaterra, Argentina (Mal de Aguapey) (12) y Brasil (Mal do Alegrete) (3).

El objetivo de este trabajo fue determinar la etiología de una importante mortandad de bovinos cruza Cebú que persiste desde hace años en la zona del arroyo Clara del departamento de Tacuarembó

PERFIL DEL ESTABLECIMIENTO

El estudio se realizó en el establecimiento “Los Brahman S.G.” ubicado en la localidad de Clara, novena sección 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 cruza cebuinas, habiéndose importado reproductores Brahman puros desde Argentina al comienzo de la explotación y actualmente el total de bovinos asciende a 5400 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, habiendo además lanares ocupando un rubro secundario en el establecimiento.

Tanto en el establecimiento como en la zona se detectan casos clínicos de hipofosforosis, 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 que los niveles de fósforo en las pasturas sea bajo. No existen reservas forrajeras en el establecimiento y solo se suplementan los animales del plantel, distribuyéndose sal con harinas de hueso.

ANTECEDENTES Y DESCRIPCIÓN DEL BROTE

A partir de los meses de febrero a abril de 1989 coincidiendo con una gran sequía se registran treinta muertes de animales de un total de 300 vacas de cría, habiéndose observado una sintomatología clínica de incoordinación, temblores musculares, dificultad respiratoria con postración y muerte. Los resultados de las necropsias realizadas daban un diagnóstico presuntivo de enfermedad viral, (Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueitis infecciosa, Fiebre catarral maligna). Los análisis 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 patológico. Los análisis bioquímicos mostraron niveles de fosfatemia de 2,6 mg/%, valores muy inferiores al rango normal.

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

SINTOMATOLOGIA CLINICA Y HALLAZGOS DE NECROPOSIA

Las vacas en su mayoría con cría al pie, presentan al comienzo debilidad del tren posterior y terminan en decúbito esternal y luego decúbito lateral. El síntoma más característico que permite detectar precozmente a los animales afectados se presenta al mover el rodeo durante un buen rato y en distancias relativamente largas, donde los animales 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 resistencia al ser enlazadas, en otras se observa cierta depresión de sensorio, mientras que algunas en cambio, permanecen en decúbito manifestando una actitud de alerta arrastrándose a través de sus miembros anteriores. Se observa a nivel del rodeo osteofagia y es frecuente ver los animales rodeando los cadáveres y lamiéndolos, destacándose el gran pisoteo del suelo alrededor de los cadáveres. En ningún caso se observó hipertermia, como tampoco diarrea, habiéndose observado en algunos pocos casos pérdida de sensibilidad cutánea en el tren posterior, y permitiéndose en los animales en decúbito la fácil movilización de los miembros sin ofrecer resistencia alguna.

Otro síntoma característico encontrado en casi todas las vacas afectadas es la flacidez de la lengua, la cual se puede retirar con extrema facilidad, y al cesar la tracción permanece colgante. El cuadro es de hipotonía general que incluye el esfínter anal pero los animales presentaban constipación.

El curso de la Enfermedad es variable permaneciendo algunos de los animales enfermos hasta 20 días mientras que otros mueren a los tres o cuatro días.

En la necropsia se observó líquido en 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 cuajo tales como piedras, huesos, cucharas de agua como también larvas de mosca, lo que se asocia casi seguramente a lo observado en los animales de rodear y lamer los cadáveres.

PATOLOGIA CLINICA

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. En el momento de la necropsia se investigó glucosa en la orina, evidenciando en una de las muestras glucosuria.

DIAGNOSTICO PRESUNTIVO

El profesional actuante, sobre la base de los antecedentes del caso, al estudio de la sintomatología clínica y a los hallazgos de necropsia realiza un diagnóstico presuntivo de intoxicación por toxinas del ***Clostridium botulinum*** remitiendo material al laboratorio a fin de realizar un diagnóstico etiológico.

El material remitido al laboratorio consistió en trozos de hígado, bazo, cerebro y contenidos de rumen, redecilla, librillo, e intestino, así como sangre, todos ellos refrigerados en cajas de tergopol.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

En el laboratorio los materiales fueron 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.

ESTUDIOS TOXICOLOGICOS

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 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. Los ratones inoculados fueron observados durante 10 días registrándose diariamente síntomas clínicos y muertes, dejándose en todos los casos animales controles sin inocular.

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 inactivación por calor se pusieron las muestras en recipientes estériles y se inactivaron durante 10 minutos a 100°C inoculándose luego dos ratones con 0,5ml; paralelamente se inocularon dos ratones con el mismo material sin inactivar, el que actuó como control de prueba.

Para la seroneutralización se utilizaron sueros antibotulínicos 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.

ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS

De los macerados usados para el estudio de toxina, se les hizo tratamiento con etanol 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 el calor a 70°C durante 10 minutos, luego se incubaron a 37°C durante 7 días. Terminada la incubación se realizaron frotis teñidos por el método de Gram, y 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.

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 en los ratones inoculados. Dicho efecto patogénico desapareció por la inactivación a 100°C por 10 minutos y por la neutralización con antitoxina botulínica de los tipos 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 de 0,25 U.I. no hubo protección con los dos tipos de antitoxina.

En todos los casos los controles del contenido intestinal sin inactivar y sin neutralizar presentaban síntomas y murieron dentro de las 24 horas de la inoculación.

En los estudios microbiológicos, todos los cultivos fueron negativos a la inoculación intraperitoneal en ratones, por lo que no se realizaron estudios posteriores.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

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

En el presente trabajo los antecedentes descriptos, la presencia estacional de la enfermedad en zonas con elevada carencia de fósforo, así como la sintomatología clínica descrita, dan bases sólidas para realizar el diagnóstico presuntivo de intoxicación por toxina botulínica; presentaciones similares de esta enfermedad se dan en países como Sudáfrica, Australia, Argentina y Brasil (2, 3, 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 Sudáfrica y Australia (4, 7, 8, 9).

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

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que sería de importancia hacer estudios epidemiológicos en la zona estudiada con el finalidad de adoptar criterios de control basados en la inmunoprofilaxis, suplementación con fósforo y eliminación de los cadáveres como segura fuente de diseminación de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Blood, D.C. ,Radositis, O.H. Henderson, J.A Veterinary Medicine.6ª.th.Edi-
London:BalliereTindall, 1983, 539-540.
2. Craven, C.P. ,Aust.Vet.J.1964, 40:127-130
3. Hubinger Tocarni, C. , et al Pesq. Agrop. Bras. 1970, 5:465-472.
4. Mosar, J.H. et al. J.A.V.M.A., IX: 65-70
5. Sakaguchi, G , Univ. of Osaka Prefecture, College of Agriculture. Sakai Shi,
Osaka 591. Japan
6. Smith, L.D. Holdeman, L.V. , The patogenic Anaerobic Bacteria, Spingfield,
Charles L. Thomas
7. Simmons, G.C. , Tammendaghi, L. , Aust. Vet. J, !964, 40:123-127
8. Sterne, M. , Batty, I. Pathoghenic Clostridia, -Butterworth. 1975.
9. Sterne, M. ,Wentzel ,L.M. ,Jour. of Inmun. 1950, 65:173-183.
10. Sugiyama, H. Rev. Infect. Dis. , 1979, I: 683-687.
11. Sugiyama, H. Microbiological Review, 1980, 44:419-448.
12. Zurhinger, C.p. , et. al Vet.arg. 1986, 28:751-755.