

Ocorrência e distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D em áreas de criação de búfalos na Baixada Maranhense¹

Tânia M.D. Silva², Iveraldo S. Dutra³, Raimundo N. Castro⁴ e Jürgen Döbereiner⁵

ABSTRACT.- Silva T.M.D., Dutra I.S., Castro R.N. & Döbereiner J. 1998. [Occurrence and distribution of *Clostridium botulinum* type C and D spores in buffalo breeding areas of the Baixada Maranhense, Maranhão, Brazil.] Ocorrência e distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D em áreas de criação de búfalos na Baixada Maranhense. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 18(3/4):127-131. Depto Apoio, Produção e Saúde Animal, Unesp - Campus de Araçatuba, Cx. Postal 533, Araçatuba, SP 16015-050, Brazil.

As botulism is a common disease in buffaloes raised in the low lands of the State of Maranhão, Brazil, the occurrence of *Clostridium botulinum* spores was evaluated in buffalo breeding areas of 4 municipalities in the "Baixada Maranhense". Twenty eight samples of faeces, mud and soil were collected and divided into 140 subsamples, being 40 of faeces, 65 of mud and 35 of soil. Botulinum toxin was detected in the filtrates of 104 cultures (74.28%) from 140 subsamples through the inoculation of mice. Using the microcomplement fixation technique for the identification of *C. botulinum* toxins, type C (14.29%), D (82.14%) and CD complex (3.57%) were found. No significant differences ($P > 0.05$) between faeces, mud and soil samples were observed. There was a high contamination with *C. botulinum* spores of the buffalo faeces, mud and soil in the areas studied. Identification of other types and subtypes of *C. botulinum* was not attempted.

INDEX TERMS: *Clostridium botulinum*, faeces, mud, soil, buffalo, Baixada Maranhense, Brazil.

RESUMO.- Botulismo é enzoótico na criação de búfalos da Baixada Maranhense, Estado do Maranhão. No presente trabalho foram realizados estudos para verificar a ocorrência e distribuição de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D em amostras de solo, limo e fezes de búfalos, colhidas aleatoriamente em áreas inundáveis da criação de búfalos nessa Baixada. A evidenciação de esporos foi realizada em 40 amostras de fezes, 65 de limo e 35 de solo, provenientes de quatro municípios, pelo cultivo em meio de cultura com carne cozida e posterior inoculação do sobrenadante filtrado em camundongo, na tentativa de verificação da presença de toxina

botulínica. A tipificação de amostras positivas foi realizada pela microficação de complemento. Os resultados revelaram que 104 (74,28%) das 140 amostras examinadas foram positivas para a presença de esporos de *C. botulinum* pelo teste indireto. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os valores obtidos quando das análises das amostras de solo (77,1%), limo (60,0%) e fezes (95,0%). Das 28 amostras de solo, limo e fezes positivas, que foram utilizadas para a tipificação, quatro (14,29%) foram classificadas como tipo C, 23 (82,14%) como tipo D e uma (3,5%) como pertencente ao complexo CD. Os resultados revelaram uma alta contaminação ambiental por *C. botulinum* em áreas de criação de búfalos da Baixada Maranhense. A identificação de outros tipos e de subtipos de *C. botulinum* não foi realizada.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Clostridium botulinum*, fezes, limo, solo, búfalo, Baixada Maranhense, Brasil.

INTRODUÇÃO

Botulismo é uma enfermidade causada pela ação da neurotoxina produzida por *Clostridium botulinum*, caracterizada principalmente pela paralisia da musculatura esquelética, poden-

¹Aceito para publicação em 22 de abril de 1998.

²Aluna de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ.

³Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Unesp - Campus de Araçatuba, Curso de Medicina Veterinária, Caixa Postal 533, Araçatuba, SP 16015-050; bolsista do CNPq.

⁴Secretaria da Agricultura do Estado do Maranhão, Pinheiro, MA.

⁵Projeto Sanidade Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970; bolsista do CNPq.

do acometer mamíferos, aves e peixes. O microrganismo é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos, móvel, de extremidades arredondadas e esporos geralmente terminais. Ocorre sob duas formas na natureza: quando não possui boas condições para a sua multiplicação, é encontrado sob a forma esporulada, na qual sobrevive no meio ambiente por vários anos; algumas estirpes de *C. botulinum* podem resistir por até 5 minutos à temperatura de 180°C. Quando as condições são favoráveis, passa para a forma vegetativa onde inicia a sua multiplicação e eventual formação de toxina. Para que isto ocorra, são necessários temperatura, umidade e pH adequados, decomposição de substrato orgânico animal ou vegetal e anaerobiose. As toxinas produzidas por *C. botulinum* estão entre as mais potentes da natureza. Classificadas dentro dos tipos A a G, elas são antigenicamente distintas, apresentam ação farmacológica semelhante e variações de susceptibilidade nas diferentes espécies animais. Os tipos C e D estão mais comumente envolvidos nas intoxicações dos bovinos (Tokarnia et al. 1970, Smith 1977, Döbereiner et al. 1992, Dutra et al. 1993, Kriek & Odendaal 1994).

O botulismo em bovinos foi descrito por Theiler (1920) na África do Sul, onde a enfermidade era conhecida pelo nome de "lamsiekte" (doença paralisante). No Brasil, o botulismo epizootico dos bovinos foi relatado pela primeira vez por Tokarnia et al. (1970) no Estado do Piauí, conhecido regionalmente como "doença da mão dura". Nas décadas seguintes, o botulismo foi diagnosticado em quase todo o território brasileiro, tendo sido responsabilizado por grandes prejuízos econômicos (Döbereiner et al. 1992).

O botulismo enzoótico em búfalos foi descrito por Langenegger & Döbereiner (1988), na Baixada Maranhense. Na ocasião, o diagnóstico foi baseado nos sinais clínico-patológicos e na existência de condições epizootiológicas. A contaminação ambiental por esporos de *C. botulinum* geralmente indica uma maior probabilidade de ocorrência da enfermidade. O presente trabalho pretendeu verificar a ocorrência e distribuição de esporos de *C. botulinum* em amostras de solo, limo e fezes, colhidas em áreas de criação de búfalos na Baixada Maranhense.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita das amostras

As amostras de solo, limo e fezes de búfalos foram colhidas aleatoriamente em campos inundáveis de quatro municípios (Pinheiro, Matinha, Viana e São Bento) da Baixada Maranhense, Estado do Maranhão. As amostras, mantidas sob refrigeração, foram processadas no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Curso de Medicina Veterinária, Araçatuba, São Paulo. As amostras compostas de solo foram colhidas em diferentes locais. Após a homogeneização, foram constituídas amostras de aproximadamente 1 kg. As amostras de limo foram colhidas de poças de água estagnada, com aproximadamente 30 a 50 cm de profundidade e também em locais onde a lâmina d'água não ultrapassava os 30 cm e eram utilizados pelos búfalos. As amostras de fezes de búfalos foram colhidas diretamente do solo. Quando do processamento, procurou-se sempre colher material do interior do bolo fecal para a análise bacteriológica.

Pesquisa de esporos de *Clostridium botulinum*

Das amostras compostas foram sementeas 2 g do material em meio de cultura Wright, contendo carne cozida. Os tubos recém-semeados foram aquecidos a 100°C em Banho Maria durante 15 min e incubados a 37°C por 5 dias. Após este período foi realizada a centrifugação e filtração (Millipore 0,45 mm) do sobrenadante.

Bioensaio em camundongo

A tentativa de evidência de toxina botulínica no sobrenadante foi realizada pela inoculação de 0,5 ml via intraperitoneal em camundongos albinos suíços com peso corporal em torno de 20 g. Os sintomas e eventual morte foram observados durante 4 dias. Como controle foram inoculados camundongos com sobrenadante inativado a 100°C por 10 min. Amostras positivas com maior letalidade, determinada pelo período de evolução entre a inoculação até a morte, foram utilizadas para a tipificação da toxina.

Tipificação da toxina botulínica pela Microfixação de Complemento

Para a tipificação da toxina botulínica foi utilizado o teste de Microfixação de Complemento (MFC), conforme descrito por Weiss & Weiss (1988). Toxinas botulínicas tipos C e D, mantidas no Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, Unesp - Campus de Araçatuba, foram utilizadas como controle positivo. As antitoxinas botulínicas C e D foram obtidas no Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dinamarca e Instituto Pasteur de Paris, França, respectivamente.

Análise estatística

Foi aplicado o teste do χ^2 com o intuito de se testar a hipótese nula de que o número de amostras positivas no Bioensaio em Camundongo era igual a 33,3% nas amostras de solo, limo e fezes ou a hipótese alternativa de que era diferente de 33,33%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esporos de *Clostridium botulinum* podem ser encontrados no ambiente onde permanecem viáveis por vários anos, mesmo em pequena quantidade, sem no entanto causar problemas à saúde animal; até encontrar condições adequadas para a sua multiplicação e eventual produção de toxinas (Smith 1977).



Fig. 1. Campo da Baixada Maranhense apresentando lâmina d'água abaixo de 30 cm e grande quantidade de matéria orgânica em decomposição, agosto de 1997, município de Matinha, MA.

Condições ambientais e de manejo, aparentemente favoráveis para a perpetuação de *C. botulinum*, podem ser encontradas na Baixada Maranhense (Fig. 1). Os campos inundáveis permanecem parcialmente cobertos por água no período das chuvas (novembro a maio). Com o início do período seco (julho a novembro), o volume de água diminui gradualmente, permitindo, ainda com a presença da lâmina d'água, o surgimento de vegetação nativa, que se constitui num excelente alimento para o búfalo (Fig. 2). Com o agravamento da seca (Fig. 3), formam-se inúmeras poças que tendem a ficar com água estagnada e com grande quantidade de matéria orgânica em decomposição. Os campos de várzeas, como são também conhecidos, tem cobertura vegetal composta principalmente por ciperáceas (*Cyperus* spp e *Heliocharis* sp), seguidas de gramíneas e plantas herbáceas. A temperatura média na região varia entre 25,4 e 27°C. Atualmente estas áreas são utilizadas para a criação extensiva e predominante de búfalos, seguido em menor escala de bovinos, equinos,



Fig. 2. Campo localizado no município de Matinha, no início do período seco, quando cresce a vegetação nativa da Baixada Maranhense.



Fig. 3. Aspecto de área utilizada no criatório de búfalos, localizada no município de São Bento, Baixada Maranhense, no auge do período seco.

suínos e patos. A bubalinocultura foi introduzida na região nos anos de 1971 a 1974. Ainda na década de 70 foram registrados surtos de botulismo em búfalos, associando-se na ocasião a sua ocorrência à existência de poças d'água, onde eventualmente seriam criadas as condições para a formação de toxina botulínica (Langenegger & Döbereiner 1988).

Informações colhidas em 17 criatórios de búfalos localizados na Baixada Maranhense, indicam que o botulismo é uma preocupação constante na região, evidenciada principalmente pela quantidade de produtores que utilizam a vacina botulínica. De relevância ainda deve ser considerado o fato de praticamente inexistir o hábito na região de se eliminar corretamente cadáveres de animais mortos, a observação de osteofagia em búfalos e a praticamente ausência de suplementação mineral (Silva 1998).

No presente trabalho foram colhidas amostras de solo, limo e fezes nos campos da Baixada Maranhense com o objetivo de verificar a ocorrência e distribuição de esporos de *C. botulinum*. A procedência dos 140 materiais examinados, assim como a sua natureza, e os resultados do bioensaio em camundongo são apresentados no Quadro 1. Pelo exame

Quadro 1. Procedência e resultado do Bioensaio em Camundongo dos materiais colhidos na Baixada Maranhense e examinados para a presença de esporos de *C. botulinum* pelo exame indireto

Procedência	Material		
	Solo	Limo	Fezes
Pinheiro	12/15 (80%) ^a	20/25 (80%)	29/30 (97,6%)
São Bento	04/05 (80%)	08/15 (53,3%)	-
Matinha	06/10 (60%)	09/15 (60%)	09/10 (90%)
Viana	05/05 (100%)	02/10 (20%)	-
Total	27/35 (77,1%)	39/65 (60%)	38/40 (95%)

^aNúmero de amostras positivas/número de amostras examinadas; percentagem.

indireto, foi possível detectar *C. botulinum* em 27 (77,1%) amostras de solo examinadas, em 39 (60,0%) amostras de limo e em 38 (95,0%) amostras de fezes de búfalos, não ocorrendo diferença significativa ($P > 0,05$) entre os números de amostras positivas dos materiais estudados. Das 140 amostras examinadas, 104 (74,28%) foram positivas para o microrganismo. Estes resultados demonstram claramente a alta contaminação ambiental de áreas de criação de búfalos da Baixada Maranhense por *C. botulinum*, e se aproximam, em termos percentuais, dos obtidos por Smith & Moryson (1975) na Inglaterra. No entanto, são significativamente superiores aos encontrados em outros trabalhos que procuraram evidenciar a contaminação ambiental em regiões da França, Inglaterra, Bangladesh (Smith 1975, Smith & Milligan 1979, Huss 1980). Smith & Moryson (1977) e Smith & Young (1980) constataram uma baixa prevalência de *C. botulinum* no solo, quando comparado com o limo. No presente estudo, a intensidade da contaminação ambiental não diferiu estatisticamente entre os materiais estudados. Vários fatores podem contri-

buir para os resultados de levantamentos sobre a intensidade da contaminação ambiental por *C. botulinum*. Dentre eles destacam-se a época do ano (Sandler et al. 1993), tipo de solo (Leitão & Delazari 1983), presença de surtos de botulismo e movimentação de animais responsáveis pela contaminação fecal (Smith & Young 1980), águas estagnadas (Langenegger & Döbereiner 1988), presença ou não de microrganismos inibidores (Graham 1978) e a existência de cadáveres na pastagem. No Brasil, Souza & Langenegger (1989) obtiveram 32,38% de positividade em amostras de solo colhidas em torno de cadáveres de bovinos supostamente acometidos pelo botulismo, identificando os tipos A(21,57%), B(9,98%), C(18,14%), D(20,1%), Complexo CD (37,74%) e G (1,47%), evidenciando assim a sua importância em termos de formação e disseminação de esporos. A ocorrência de esporos em valas de retenção, no solo e fezes de bovinos, colhidos nas proximidades ou dentro de coleções de água em pastagem de bovinos, revelaram a presença de *C. botulinum* tipos C e D, com predominância de amostras positivas nas áreas de sedimentação das poças (88,0%), seguido das fezes (32,0%) e em menor quantidade nas amostras de solo (3,2%) colhidas nas adjacências (Dutra & Döbereiner 1995). Da mesma forma, foram detectados os tipos C e D em poças d'água, com a presença ou não de cadáveres de animais no seu interior, associadas à ocorrência de surtos de botulismo em bovinos no Brasil (Dutra et al. 1990).

A alta percentagem de amostras positivas para *C. botulinum* obtida neste trabalho pode ser atribuída às condições ecológicas e de manejo propícias ao microrganismo e existentes na Baixada Maranhense, com longos períodos de elevado calor, água estagnada com pouca profundidade e abundância de matéria orgânica em decomposição. Estes fatores são essenciais à multiplicação e conseqüente perpetuação da bactéria no ambiente (Smith 1976). Por outro lado, devem ser considerados relevantes os fatos de já terem sido registrados na região surtos de botulismo envolvendo búfalos (Langenegger & Döbereiner 1988) e a inexistência da prática de eliminação de cadáveres de animais mortos por qualquer causa.

A tipificação de 28 amostras positivas no Bioensaio em Camundongo foi realizada pela Microfixação de Complemento (Quadro 2). Os resultados revelaram a predominância de *C. botulinum* tipo D (82,14%), seguido do tipo C (14,29%) e de

Quadro 2. Resultado dos materiais examinados pelo Bioensaio em Camundongo e da tipificação pela Microfixação de Complemento

Material	Nº subamostras	Nº subamostras positivas no Bioensaio	%	Nº amostras examinadas pela MFC	Tipos de toxina		
					C	D	CD ^a
Solo	35	27	77,1	07	1	6	-
Limo	65	39	60,0	13	3	9	1
Fezes	40	38	95,0	08	-	8	-
Total	140	104	7	28	4	23	1

^aToxina botulínica tipo C, D ou complexo CD.

apenas uma amostra (3,57%) classificada como pertencente ao complexo CD. *C. botulinum* tipos B e E são os mais prevalentes no ambiente em regiões do Hemisfério Norte (Smith & Moryson 1975, Smith et al. 1977, Smith et al. 1978), com variações na sua ocorrência e distribuição geográfica. Segundo Kriek & Odendaal (1984), os tipos C e D são mais frequentemente isolados nos países do Hemisfério Sul. Os surtos de botulismo em bovinos na América do Sul estão relacionados na maioria das vezes com as toxinas produzidas pelos tipos C e D (Tokarnia et al. 1970, Zürbriggen et al. 1986, Dutra et al. 1993), refletindo geralmente os tipos predominantes no solo (Haagsma, 1973).

Notermans et al. (1981) verificaram o aumento no número de esporos de *C. botulinum* nas fezes de bovinos quando os animais eram alimentados com forragem contaminada, demonstrando a importância das fezes na sua disseminação. Os tipos C e D também foram demonstrados nas fezes de aves domésticas que se alimentavam no pasto. Pelo número de amostras de fezes positivas obtidas no presente trabalho, fica evidente que também na Baixada Maranhense os animais ao se alimentarem em área altamente contaminada, ingerem os esporos e o eliminam pelas fezes, facilitando assim a sua perpetuação de forma cíclica.

A alta contaminação ambiental por *C. botulinum*, predominantemente pelo tipo D, associada a um somatório de fatores existentes na Baixada Maranhense, indicam a possibilidade permanente de ocorrência de surtos de intoxicação, ao mesmo tempo em que revelam a importância e necessidade de estudos sistemáticos sobre os impactos ambientais da criação de animais, nos modelos tradicionais, em ecossistemas complexos como o da região.

Agradecimentos. Os autores gostariam de externar o seu reconhecimento à técnica de laboratório Rosa M. M. Ferreira pelo excelente apoio laboratorial na realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Döbereiner J., Tokarnia C.H., Langenegger J. & Dutra I. 1992. Epizootic botulism of cattle in Brazil. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 99:188-190.
- Dutra I.S. & Döbereiner J. 1995. Occurrence and distribution of *Clostridium botulinum* in basins of rain-water captivation on cattle pasture. 7th Int. Symposium on Microbial Ecology, Santos, São Paulo, Brazil, p. 180. (Abstract)
- Dutra I.S., Döbereiner J., Rosa I.V. & Bond V. 1990. Botulismo de origem hídrica em bovinos no Brasil. XVI World Buiatrics Congress, Salvador, Bahia, p. 547-550.
- Dutra I.S., Weiss H.-E., Weiss H. & Döbereiner J. 1993. Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. Pesq. Vet. Bras. 13(3/4):83-86.
- Graham J.M. 1978. Inhibition of *Clostridium botulinum* type C by bacteria isolated from mud. J. Appl. Bacteriol. 45(2):205-211.
- Haagsma J. 1973. Aetiology and epidemiology of botulism in waterfowl in the Netherlands, with special reference to thermal water pollution and public health. Thesis, Fakulteit der Diergeneeskunde, Rijkuniversiteit Utrecht. 205 p. (Resumo)
- Huss H.H. 1980. Distribution of *Clostridium botulinum*. Appl. Environ. Microbiol. 39(4):764-769.
- Kriek N.P.J. & Odendaal M.W. 1994. Botulism, p. 1354-1371. In: Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C. (ed.) Infectious Diseases of Livestock. Oxford Press, Cape Town.

- Langenegger J. & Döbereiner J. 1988. Botulismo enzoótico em búfalos no Maranhão. *Pesq. Vet. Bras.* 8(1-2):37-42.
- Leitão M.F.F. & Delazari J. 1983. *Clostridium botulinum* em solo no Estado de São Paulo. *Col. ITAL, Campinas*, 13: 75-82.
- Notermans S., Dufrenne J. & Oosterom J. 1981. Persistence of *Clostridium botulinum* type B on a cattle farm after an outbreak of botulism. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(1):179-183.
- Sandler R.J., Rocke T.E., Samuel M.D. & Yuill T.M. 1993. Seasonal prevalence of *Clostridium botulinum* type C in sediments of a northern California wetland. *J. Wildlife Dis.* 29(4):533-539.
- Silva T.M.D. 1998. Ocorrência de esporos de *Clostridium botulinum* tipos C e D em áreas de criação de búfalos na Baixada Maranhense. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 65 p.
- Smith L.D. 1975. The inhibition of *Clostridium botulinum* by strains of *Clostridium perfringens* isolated from soil. *Appl. Microbiol.* 30: 319-323.
- Smith G.R. 1976. Botulism in waterfowl. *Wildfowl* 27:129-138.
- Smith L.D. 1977. Botulism: the organism, its toxins, the disease. Charles Thomas, Springfield. 236 p.
- Smith G.R. & Milligan R.A. 1979. *Clostridium botulinum* in soil on the site of the former metropolitan (Caledonian) Cattle Market, London. *J. Hyg.* 83(2):237-241.
- Smith G.R. & Moryson C.J. 1975. *Clostridium botulinum* in the lakes and waterways of London. *J. Hyg.* 75(3):371-379.
- Smith G.R. & Moryson C.J. 1977. A comparison of the distribution of *Clostridium botulinum* in soil and the lake mud. *J. Hyg.* 78(1):39-41.
- Smith G.R. & Young A.M. 1980. *Clostridium botulinum* in British soil. *J. Hyg.* 85(2):271-274.
- Smith G.R., Moryson C.J. & Walmsley J.G. 1977. Low prevalence of *Clostridium botulinum* in the lakes, marshes and waterways of the Camargue. *J. Hyg.* 78(1):33-37.
- Smith G.R., Milligan R.A. & Moryson C.J. 1978. *Clostridium botulinum* in aquatic environments in Great Britain and Ireland. *J. Hyg.* 80(3):423-438.
- Souza A.M. & Langenegger J. 1987. Esporos de *Clostridium botulinum* em torço de cadáveres decompostos de bovinos em pastagem no sul de Goiás. *Pesq. Vet. Bras.* 7(1):17-22.
- Theiler, A. 1920. Cause and prevention of lamsiekte. *J. Dep. Agric. South Africa* 1:221-244.
- Tokarnia C.H., Langenegger J., Langenegger C.H. & Carvalho E.V. 1970. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.* 5:465-472.
- Weiss H.-E. & Weiss H. 1988. Nachweis von *Clostridium botulinum*-Toxin mittels Mikro-Wärmekomplementbindungsreaktion. *Tierärztl. Umschau* 43:117-126.
- Zürbruggen M.A., Soni C.A., Pasini. M.I., Khon R.A.B., Rochinotti D., Lopes G. A.C., Fere G.R.S., Laphitz E. & Vanzine V.R. 1986. Botulismo bovino en la Bacia de Corrientes (Argentina). *Vet. Argent.* 11(28):751-755.