

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal



Universidade de Cuiabá



CAETANA STUCCHI

**AVALIAÇÃO CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICA DE BOTULISMO EM CÃES DE UMA
POPULAÇÃO HOSPITALAR DO CENTRO-OESTE DO BRASIL**

Cuiabá, 2014

CAETANA STUCCHI

**AVALIAÇÃO CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICA DE BOTULISMO EM CÃES DE UMA
POPULAÇÃO HOSPITALAR DO CENTRO-OESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal, da Universidade de Cuiabá – UNIC como
requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Mendes Amude

Cuiabá, 2014

CAETANA STUCCHI

**AVALIAÇÃO CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICA DE BOTULISMO EM CÃES DE UMA
POPULAÇÃO HOSPITALAR DO CENTRO-OESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Bióciência Animal, da Universidade de Cuiabá – UNIC como
requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador Prof. Dr. Alexandre Mendes Amude

Membro Titular Prof. Dr. Lázaro Manoel de Camargo

Membro Titular Profa. Dra. Michelle Igarashi

Cuiabá, 08 de Maio de 2014.

Conceito Final: _____

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais para Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecária Elizabete Luciano / CRB1-2103

S929a

Stucchi, Caetana

Avaliação Clínica-Epidemiológica de Botulismo em Cães de uma População Hospitalar do Centro-Oeste do Brasil./ Caetana Stucchi. Cuiabá, MT, 2015.
79p.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, da Universidade de Cuiabá – UNIC, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Mendes Amude

1.Introdução. 2.Revisão Bibliográfica. 3.Objetivos. 4.Artigo Científico: Avaliação Clínica-Epidemiológica de Botu em Cães de uma População Hospitalar do Centro-Oeste do Brasil.
5.Conclusão da Dissertação. 6.Anexos.

CDU 616.314

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que com sua grandeza esteve sempre guiando meus passos e iluminando meu caminho durante todos os anos da minha vida. Aos meus pais João Caetano e Heloisa, aos meus avôs paternos Olinda e Paulo, ao meu querido namorado Paulo e aos meus cachorros Johnny e Frederico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que me concedeu saúde, paz, harmonia e sabedoria, permitindo assim, a busca pelo conhecimento e felicidade.

Agradeço aos meus pais João Caetano e Heloisa, a compreensão pelos momentos ausentes e difíceis, ao apoio incondicional, o amor não mensurável e aos ensinamentos. Ensinamentos estes que formaram o caráter, a dignidade, a perseverança e a personalidade que hoje me pertencem.

Agradeço a minha irmã, Natália, por me mostrar o quão mais forte e indiferente a pequenos obstáculos podemos ser. Aos meus avós paternos, Olinda (em memória) e Paulo, por acreditarem em minha capacidade desde o início, apoiando e ajudando em cada decisão.

Agradeço ao meu namorado, Paulo, cada minuto de companheirismo dentro e fora da universidade. Pela fidelidade, amizade e integridade de um relacionamento com amor, respeito e parceria. Aos meus queridos amigos de quatro patas, Johnny, Frederico e Thor agradeço por me ensinarem a cada dia a grandeza do sentimento expresso sem palavras, por me ensinarem o que não tem sobre linhas de livros ou pesquisas.

Em especial, agradeço meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Mendes Amude; pessoa esta que possui humildade, caráter, sabedoria e inteligência inestimáveis e indiscutíveis; pela paciência, ajuda e contribuição por grande parte da carga de aprendizado adquirida até hoje.

Aos meus amigos, agradeço por simplesmente terem sido amigos, pelas risadas, diversão e até pelos momentos não fáceis que com vocês, não chegaram a ser difíceis. À vocês um brinde.

Para finalizar, agradeço também a todos que fizeram parte da minha vida, direta ou indiretamente, contribuindo de alguma maneira nesta conquista.

RESUMO

STUCCHI, C. **AVALIAÇÃO CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICA DE BOTULISMO EM CÃES DE UMA POPULAÇÃO HOSPITALAR DO CENTRO-OESTE DO BRASIL.** 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado Biociência Animal) – Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2014.

Botulismo é uma doença neuromuscular grave, não contagiosa, resultante da ação de uma potente toxina produzida pela bactéria anaeróbica *Clostridium botulinum*. Apresenta-se sob três formas: botulismo alimentar, botulismo por ferimentos e botulismo intestinal. Casos em caninos têm sido atribuídos à ingestão de carnes cruas ou putrefeitas contendo toxina pré-formada. Em função da gravidade da intoxicação, os cães apresentam diferentes quadros clínicos, apresentando desde instabilidade no movimento e fraqueza, até prostração profunda e paralisia flácida generalizada; quando a paralisia atinge a musculatura diafragmática e músculos intercostais o animal apresenta dispnéia grave podendo levar ao óbito. O estudo clínico e epidemiológico do botulismo em cães tem importância na avaliação das desordens da junção neuromuscular nos animais domésticos de companhia. Este trabalho teve como objetivo realizar uma avaliação clínica-epidemiológica de botulismo em cães portadores de desordem neuromuscular, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá - Mato Grosso, no período de junho de 2010 a março de 2014. O diagnóstico foi estabelecido por procedimentos padrões adotados para triagem das enfermidades, e visaram diagnosticar as diferentes afecções que levam ao curso clínico de alteração neuromuscular como botulismo, *Miastenia gravis*, polirradiculoneurite idiopática, polirradiculite/miosite por protozoários, polimiosite e/ou polineuropatia idiopática, polineuropatia/miopatia metabólica, distúrbios eletrolíticos e síndromes paraneoplásicas. Durante o período foram admitidos 44 pacientes com desordem neuromuscular e o botulismo foi diagnosticado em 22 animais com tetraparesia flácida de origem neuromuscular. Dezoito (18) cães desenvolveram botulismo devido à provável ingestão da neurotoxina botulínica através de carcaça de animais, restos de lixo em decomposição, ou alimento caseiro deteriorado; em 02 animais o botulismo ocorreu devido a presença de fetos em decomposição no útero, 01 animal apresentou botulismo intestinal e 01 apresentou botulismo por ferimentos. Não houve correlação da doença com o sexo ou idade dos animais.

Palavras chave: Botulismo, tetraparesia flácida, afecção neuromuscular, cães.

ABSTRACT

STUCCHI , C. **CLINICAL EVALUATION OF EPIDEMIOLOGICAL - BOTULISM IN DOGS OF A POPULATION OF BRAZIL 'S HOSPITAL CENTER WEST** . 2014. 80 f. Dissertation (Master Bioscience Animal) - University of Cuiabá , Cuiabá , 2014 .

Botulism is a serious neuromuscular, not contagious affection, resulting from the action of a potent toxin produced by the anaerobic bacterium *Clostridium botulinum*. It comes in three forms: foodborne botulism, wound botulism and intestinal botulism. Botulism in dogs has been attributed to eating raw meat or putrefies containing preformed toxin. Depending on the severity of poisoning, dogs have different clinical manifestations, varying from instability and weakness in the movement to profound prostration and generalized flaccid tetraparesis; when the paralysis affects the diaphragmatic and intercostal muscles the animal develop severe dyspnea that may lead to death. The clinical and epidemiological study of botulism in dogs is important in the evaluation of neuromuscular junction disorders in domestic companion animals. The aim of this study was to perform a clinical and epidemiological evaluation of botulism in dogs presented with neuromuscular disorder. In order to accomplish this, patients with neuromuscular presentation of the Teaching Veterinary Hospital from the University of Cuiabá - Mato Grosso, from June 2010 to March 2014 were followed up. The diagnosis was established by neurological routine procedures performed in order to diagnose the different conditions that lead to the clinical picture of neuromuscular disease such as botulism, myasthenia gravis, idiopathic polyradiculoneuritis, protozoal polyradiculoneuritis, polymyositis, idiopathic polyneuropathy, metabolic polymyopathy/polyneuropathy, electrolyte disorders and paraneoplastic syndromes. During the study 44 dogs admitted with neuromuscular disorder were followed up and botulism was diagnosed in 22 dogs with flaccid tetraparesis. Eighteen (18) dogs had developed botulism due to intake of botulinum neurotoxin through eating animal carcasses, or garbage remains decomposed or deteriorated homemade food; in 02 animals the botulism occurred due to the presence of decomposing fetus in the uterus, 01 had developed intestinal botulism, and the other one wound botulism. There was no correlation between the disease and the sex or age of the animals.

Keywords: Botulism, flaccid tetraparesis, neuromuscular disorder, dogs.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Pacientes com tetraparesia flácida diagnosticados como botulismo e outras afecções.....	71
Tabela 02. Histórico, achados clínico e provável fonte de infecção dos pacientes diagnosticados com botulismo.....	73
Tabela 03. Tabela neurológica mostrando a apresentação clínica, reações posturais, reflexos segmentares, déficits de nervos cranianos e presença ou não do panículo em pacientes com botulismo.....	77
Tabela 04. Evolução neurológica dos pacientes com botulismo no período de internação no HOVET.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
ALT	Alanina aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca	Cálcio
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
Cl	Cloro
CPK	Creatinofosfoquinase
CREAT	Creatinina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
FA	Fosfatase Alcalina
GGT	Gama-glutamil transferase
HÁ	Hemaglutinina
IV	Intravenoso
IM	Intramuscular
JNM	Junção neuromuscular
K	Potássio
Kg	Quilograma
Mg	Magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Na	Sódio
NMI	Neurônio motor inferior
NTNHA	Molécula não tóxica de componentes não hemaglutinantes
P	Fósforo
PCR	Polimerase chain reaction
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
RAPD	DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
RNACH	Receptor nicotínico de acetilcolina
SAB	Soro antitobotulínico

SNC	Sistema nervoso central
UI	Unidade internacional
UNIC	Universidade de Cuiabá
URE	Uréia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 FISIOLOGIA DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR	18
2.1.1 Neurônio	18
2.1.2 SINAPSE	19
2.1.3 NEUROTRANSMISSORES	20
2.1.3.1 Neurotransmissor Acetilcolina – síntese e armazenamento no neurônio pré- sináptico	20
2.1.4 JUNÇÃO NEUROMUSCULAR	21
2.1.4.1 Liberação da acetilcolina na JNM	23
2.1.4.2 Acoplamento da ACh ao receptor RNACH e contração muscular	23
2.1.4.3 Inativação da ACh na fenda sináptica	24
2.2 BOTULISMO	25
2.2.1 TIPOS DE BOTULISMO	26
2.2.1.1 Botulismo Alimentar	26
2.2.1.2 Botulismo por ferimento	27
2.2.1.3 Botulismo Intestinal	28
2.2.2 AGENTE ETIOLÓGICO – <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> E AS NEUROTOXINAS	29
2.2.2.1 <i>Clostridium botulinum</i>	29
2.2.2.2 Toxina Botulínica	31
2.2.3 EPIDEMIOLOGIA	32
2.2.4 PATOGENIA	34

2.2.5 SINAIS CLÍNICOS	37
2.2.6 DIAGNÓSTICO	39
2.2.6.1 Diagnóstico Bacteriológico	40
2.2.6.1.1 Métodos de cultura para <i>Clostridium botulinum</i>	41
2.2.6.1.2 Detecção molecular de <i>C. Botulinum</i>	41
2.2.6.1.3 Caracterização genética de <i>C. Botulinum</i>	42
2.2.6.2 Diagnóstico Toxicológico	43
2.2.6.3 Diagnóstico Biológico	44
2.2.6.3.1 Ensaio de letalidade em camundongo	44
2.2.6.3.2 Ensaio não letal em camundongos	45
2.2.6.4 Diagnóstico Presuntivo	46
2.2.7 TRATAMENTO	47
2.2.7.1 Tratamento suporte	48
2.2.7.2 Tratamento específico	50
2.2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	51
3 OBJETIVOS	58
3.1 OBJETIVOS GERAL	58
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
4 CAPITULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO: AVALIAÇÃO CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICA DE BOTULISMO EM CÃES DE UMA POPULAÇÃO HOSPITALAR DO CENTRO-OESTE DO BRASIL	59
4.1 INTRODUÇÃO	59
4.2 METODOLOGIA	60
4.3 RESULTADOS	62
4.4 DISCUSSÃO	63

4.5 CONCLUSÃO	67
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	68
5 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO	71
6 ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

Tetraparesia pode ser definida como perda parcial da atividade motora voluntária nos quatro membros, enquanto a tetraplegia é a perda total da atividade motora voluntária (BRAUND, 1994). A tetraparesia pode ter origem de lesões focais no tronco encefálico ou na medula espinhal cervical ou cervicotorácica; doenças difusas da medula espinhal; doenças generalizadas de nervo periférico, da junção neuromuscular ou do músculo. Pode também ser causada por doenças não neurológicas, portanto, o exame físico e neurológico minucioso são necessários para localizar a origem da fraqueza muscular (OLBY, 2004).

Na abordagem de um paciente tetraparético/plégico, é importantíssimo o reconhecimento do estado da atividade reflexa nos membros torácicos e pélvicos, uma vez que isso prevê o diagnóstico neuroanatômico (local do sistema nervoso acometido pela lesão) e orientará o raciocínio clínico para a construção de uma lista de diagnósticos diferenciais (TAYLOR, 2010). Quando ocorre preservação da atividade reflexa segmentar nos quatro membros, o quadro parético/plégico é denominado tetraparesia espástica; já quando há comprometimento da atividade reflexa (diminuição ou ausência dos reflexos segmentares) denomina-se tetraparesia flácida (BRAUND, 1994).

Nos animais com tetraparesia flácida, os membros pélvicos são geralmente afetados mais cedo e mais severamente do que os membros torácicos, a gravidade dos sinais pode variar de leve fraqueza e ataxia para tetraplegia com insuficiência respiratória. Intolerância ao exercício pode ser o único sinal apresentado em miopatias e doenças na transmissão neuromuscular (OLBY, 2004).

Os quadros de tetraparesia flácida geralmente têm origem em doenças generalizadas de nervo periférico, da junção neuromuscular ou do músculo, assim como também pode ser causada por doenças generalizadas ou multifocais da medula espinhal que acometam simultaneamente a medula cervicotorácica e lombossacra, afetando os corpos celulares que dão origem aos axônios que constituirão, respectivamente, o plexo braquial e o plexo lombossacro (BRAUND, 1994; OLBY, 2004; TAYLOR, 2010). Embora diversas sejam as possibilidades na rotina da prática de neurologia, os pacientes com tetraparesia flácida geralmente

possuem distúrbio na transmissão neuromuscular por doença generalizada de nervos periféricos ou da junção neuromuscular (OLBY, 2004).

As principais doenças causadas por distúrbio na transmissão neuromuscular são polirradiculoneurite (PANCIERA et al., 2002), *miastenia gravis*, paralisia causada por picada de carrapato, botulismo, intoxicação crônica por organofosforados, drogas que causam bloqueio neuromuscular (aminoglicosídeos, fenotiazínicos, antiarrítmicos, magnésio e metoflurano) (SHELTON, 2002), intoxicação por picada de cobra coral e envenenamento com lasalocida (ionóforo usado contra coccidiose em frangos e como promotor de crescimento para ruminantes) (URIARTE et al., 2010).

O botulismo é uma doença neuroparalítica grave, não contagiosa, resultante da ação da potente toxina produzida pela bactéria anaeróbica *Clostridium botulinum* (ASSUNÇÃO et al., 2005). A doença é considerada como intoxicação alimentar quando causada por ingestão da neurotoxina do *C. botulinum* e toxiinfecção quando ingerida a bactéria ativa, posteriormente produzindo esporos (MENDES, 2008). A doença é observada principalmente em ruminantes, eqüinos e aves, mas a ocorrência em cães, outros carnívoros (NASCENTE et al., 2005), e gatos também tem sido observada (ELAD et al., 2004; GALEY et al., 2000).

Apresenta-se sob três formas: botulismo alimentar, botulismo por ferimentos e botulismo intestinal. O local de produção da toxina botulínica é diferente em cada uma dessas formas, porém todas se caracterizam clinicamente por manifestações neurológicas e/ou gastrintestinais, podendo ter evolução grave, com necessidade de hospitalização prolongada (MENDES, 2008). Os casos em caninos têm sido atribuídos à ingestão de carnes cruas ou putrefatas contendo a toxina pré-formada (ETTINGER, 2004; NASCENTE et al., 2005).

A ingestão da toxina botulínica, com conseqüente absorção pelo trato gastrintestinal, permite a distribuição da neurotoxina na corrente sanguínea até que chegue a junção neuromuscular (JNM) impedindo a liberação de acetilcolina (Ach) pelo neurônio pré-sináptico, podendo causar tetraparesia flácida (GALEY et al., 2000; NASCENTE et al., 2005; JIN et al., 2009). A severidade dos sinais clínicos varia de acordo com a quantidade de toxina ingerida e susceptibilidade do animal (MONEGO et al., 2006; MENDES, 2008; NELSON e COUTO, 2010). Dependendo da gravidade da intoxicação, os cães apresentam diferentes quadros clínicos,

demonstrando desde instabilidade no movimento e fraqueza, até prostração profunda e paralisia flácida generalizada (SILVA et. al., 2008).

Embora sejam abundantes os trabalhos sobre botulismo em animais de produção, são escassos os artigos nacionais e internacionais sobre botulismo em cães e gatos. Dessa forma, justifica-se este estudo clínico - epidemiológico do botulismo em animais de companhia.

2 CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

2.1.1 Neurônio

Neurônio é a unidade funcional básica do sistema nervoso (GUYTON e HALL, 2006 b). O número de neurônios no sistema nervoso central (SNC) varia de aproximadamente 100 milhões em pequenos mamíferos, 100 bilhões em humanos a até 200 bilhões em baleias e elefantes (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 b).

Um neurônio possui quatro divisões morfológicas, sendo os dendritos, o corpo celular, o axônio e as terminações pré-sinápticas do axônio (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 d). O corpo celular do neurônio apresenta núcleo, retículo endoplasmático, ribossomos, aparelho de Golgi e mitocôndrias (BEHAN, 2006).

As divisões anatômicas do neurônio são importantes para o desenvolvimento das suas funções. Ele recebe sinalizações pré-sinápticas de outros neurônios através dos dendritos, transmite impulsos de potencial de ação ao longo do axônio e sinaliza a célula adjacente através da terminação pré-sináptica para outro neurônio ou para uma célula muscular.

No corpo celular, o núcleo contém a codificação para produção de proteínas, os ribossomos sintetizam as proteínas, o retículo endoplasmático rugoso é o local onde são montadas as proteínas secretoras e de membrana, e o aparelho de Golgi processa e classifica os componentes secretores (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 d).

A medula espinhal dá origem a 36 pares de nervos espinhais; as fibras nervosas dos nervos espinhais que emergem das intumescências cervical e lombar se unem para formar os nervos periféricos que inervam os músculos dos membros anteriores e posteriores, respectivamente (TAYLOR, 2010). Esses neurônios que inervam os músculos dos membros são conhecidos como neurônios motores inferiores (NMI). Os NMI têm seus corpos celulares localizados dentro da substância cinzenta do SNC (tronco encefálico e medula espinhal), e seus axônios trafegam por

tratos de substância branca no SNC e deixam o SNC pelas fibras nervosas espinhais que seguem por dentro dos nervos espinhais para fora do SNC, onde se reorganizam para constituir os nervos periféricos. Cada neurônio motor estabelece sinapse em várias fibras musculares (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 c), dessa forma, o NMI conecta diretamente o SNC ao músculo (TAYLOR, 2010).

Cada fibra muscular esquelética recebe entrada sináptica de um único neurônio motor, portanto sua contração é controlada por apenas um único neurônio (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 c).

2.1.2 SINAPSE

Toda informação é transmitida do SNC através de impulsos nervosos que se propagam por uma sucessão de neurônios, um após o outro (GUYTON e HALL, 2006 b). O local de encontro entre um neurônio e o adjacente recebe o nome de sinapse (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 b).

As sinapses podem ser elétricas ou químicas, sendo as sinapses químicas aquelas importantes para a atividade neuromuscular. Na sinapse química, o primeiro neurônio secreta no seu terminal axônico uma substância química chamada de neurotransmissor que irá atuar em receptores presentes na membrana do neurônio subsequente para promover excitação (GUYTON e HALL, 2006 b).

A sinapse é formada pela terminação pré-sináptica de uma célula (célula pré-sináptica), pela superfície receptora de outra célula (célula pós-sináptica) e pelo espaço entre estas duas células (a fenda sináptica) (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 a). Quando a célula pós-sináptica é uma célula muscular é dado o nome de sinapse neuromuscular ou JNM (BEHAN, 2006).

Na maioria das sinapses, o sinal se propaga apenas na direção anterógrada (do axônio de um neurônio precedente para os dendritos localizados em neurônios subsequentes), possibilitando que o sinal trafegue na direção necessária para executar as funções nervosas requeridas (GUYTON e HALL, 2006 b).

2.1.3 NEUROTRANSMISSORES

Em 1926 o físico e farmacologista Otto Loewi mostrou que o controle do coração pelo nervo vago era mediado por uma substância química, identificada depois como acetilcolina (ACh). Essa constatação foi aceita como a primeira demonstração da mediação química na transmissão sináptica. Só depois do surgimento do microscópio eletrônico, na década de 50 do século XX, é que a sinapse e as vesículas contendo neurotransmissores puderam ser identificadas (KLEIN, 2006).

Os neurotransmissores são mensageiros químicos que desempenham um papel fundamental na transmissão sináptica (KLEIN, 2006). Várias substâncias foram identificadas como neurotransmissores, podendo ser divididas em três categorias reconhecidas com base na sua composição química: os aminoácidos, as aminas e os peptídeos (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 a). Os neurotransmissores aminoácidos e amínicos são conhecidos como neurotransmissores de moléculas pequenas ou clássicas, e os neurotransmissores peptídicos conhecidos como neurotransmissores de moléculas grandes (KLEIN, 2006).

2.1.3.1 Neurotransmissor Acetilcolina – síntese e armazenamento no neurônio pré- sináptico

A ACh pertence à classe das aminas, portanto é um neurotransmissor de molécula pequena. A síntese da ACh ocorre no citosol do terminal axonal pré-sináptico, a partir da acetilcoenzima A e da colina, na presença da enzima colina acetiltransferase (GUYTON e HALL, 2006 b).

É comum encontrar o neurotransmissor ACh no citosol dos neurônios após a sua síntese. No entanto, durante ou logo após a síntese, as moléculas de ACh são incorporadas em vesículas de armazenamento, classificadas como vesículas sinápticas pequenas, com cerca de 50 nanômetros de diâmetro (KLEIN, 2006).

Um mecanismo de transporte dependente de energia é necessário para que ocorra o transporte do neurotransmissor ACh do citosol para o interior da vesícula

(KLEIN, 2006). O trifosfato de adenosina (ATP) produzido pelas mitocôndrias, localizadas no terminal axonal, é a fonte de energia utilizada para esse processo de transporte citoplasmático e segregação/estocagem da ACh em vesículas (GUYTON e HALL, 2006 b).

Cada vesícula normalmente contém cerca de 5.000 moléculas de ACh (BAILEY, 2006). Cerca de 300.000 vesículas sinápticas acumulam-se nos terminais nervosos de uma única junção neuromuscular (GUYTON e HALL, 2006 b).

2.1.4 JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

A JNM também é conhecida como terminal motor ou placa motora terminal (GUYTON e HALL, 2006 a).

Como em uma sinapse, a JNM apresenta três componentes; a membrana axonal do neurônio pré-sináptico, um espaço estreito entre o neurônio e a fibra muscular (fenda sináptica) e a membrana da fibra muscular pós-sináptica (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 a).

A junção ocorre no ponto médio da fibra muscular, o qual o axônio do neurônio pré-sináptico está separado da fibra muscular por um espaço de aproximadamente 50 nanômetros de largura, que é a fenda sináptica (BAILEY, 2006).

A atividade elétrica é transmitida dos axônios para as fibras musculares, levando à contração do músculo. Processo este, mediado pela liberação do neurotransmissor ACh da terminação nervosa para a fenda sináptica (TAYLOR, 2010).

No terminal axonal há grande quantidade de mitocôndrias, as quais fornecem ATP, que é a fonte de energia utilizada para a produção de ACh (GUYTON e HALL, 2006 b). A terminação pré-sináptica, local onde estão localizadas as vesículas, apresenta forma de botão recebendo o nome de botão sináptico (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 a).

O potencial de ação segue por todo o axônio do neurônio, possibilitado pela abertura e fechamento dos canais iônicos de sódio na membrana plasmática (BAILEY, 2006). Assim que o potencial de ação chega à JNM, os canais iônicos de

cálcio controlados pela voltagem, na região pré-sináptica, são estimulados a se abrir (SHELTON, 2002). A concentração intracelular de íons cálcio livre aumenta 10 a 100 vezes pelo influxo que ocorre (BAILEY, 2006).

O aumento no nível de cálcio intracelular permite que este íon se ligue a uma proteína na membrana da vesícula sináptica, desencadeando a fusão da vesícula com a membrana pré-sináptica, a abertura da vesícula e a liberação de acetilcolina na fenda sináptica através de exocitose (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 a). Cerca de 125 vesículas são liberadas na fenda sináptica (GUYTON e HALL, 2006 b). Após a liberação da ACh, a membrana da vesícula é recuperada na terminação pré-sináptica e pode ser reciclada para formar novamente uma vesícula (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 a).

A membrana da fibra muscular pós-sináptica apresenta receptores nicotínicos de ACh (RNACH), situados imediatamente abaixo de onde a ACh é liberada (GUYTON e HALL, 2006 a). Esta membrana, com RNACH, apresenta dobras juncionais que aumentam a área de superfície (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 a).

Após a liberação de ACh na fenda sináptica, esta se difunde por toda a fenda, ligando-se aos RNACH na membrana muscular pós-sináptica (TAYLOR, 2010).

O RNACH é um receptor ionotrópico, sendo um canal iônico composto por cinco subunidades protéicas (duas α , uma β , uma δ , e uma γ) que formam o poro da membrana muscular. Ambas as subunidades alfa tem um local de ligação extracelular de alta afinidade pela ACh (KLEIN, 2006).

Quando a ACh se liga a tais receptores, a conformação dos mesmos muda rapidamente de fechado para aberto, permanecendo abertos com um ligante unido por um período que varia de acordo com a espécie e a temperatura, mas geralmente se aproxima de um milésimo de segundo (BAILEY, 2006). O canal colinérgico aberto permite que íons positivos se movimentem facilmente através da abertura, como o cálcio, sódio e potássio (GUYTON e HALL, 2006 b). O influxo de sódio resulta em uma onda de despolarização no sarcolema (membrana da fibra muscular) resultando na contração muscular (SHELTON, 2002).

2.1.4.1 Liberação da acetilcolina na JNM

No neurônio em repouso as vesículas sinápticas permanecem ligadas a elementos do citoesqueleto ou umas às outras, por uma proteína denominada sinapsina I, que faz parte da membrana da vesícula (KLEIN, 2006).

Quando um potencial de ação chega ao terminal nervoso pré-sináptico gera a abertura de canais de cálcio da membrana (SHELTON, 2002). O influxo de cálcio para dentro do botão gera uma ligação do cálcio com uma proteína do citoesqueleto denominada calmodulina, essa interação leva a ativação de uma enzima que modifica a molécula de sinapsina I, ocasionando a desinserção das vesículas sinápticas do citoesqueleto ou uma das outras (KLEIN, 2006).

A liberação das vesículas sinápticas permite que estas se liguem a membrana do botão sináptico através da ligação entre a proteína da membrana vesicular (sinaptobrevina) e as proteínas da superfície interna da membrana do botão (syntaxina e SNAP-25) (KLEIN, 2009). Esta ligação permite a fusão da membrana da vesícula com a membrana pré-sináptica, a abertura da vesícula e a liberação de ACh na fenda sináptica através de exocitose (GUYTON e HALL, 2006 b). Portanto quanto maior o influxo de cálcio no terminal, maior a liberação de neurotransmissor e dos potenciais pós-sinápticos produzidos (KLEIN, 2009).

Após a liberação da ACh, a membrana da vesícula é recuperada na terminação pré-sináptica por um processo de endocitose e pode ser reciclada para formar novamente uma vesícula (CUNNINGHAM e KLEIN, 2008 a).

2.1.4.2 Acoplamento da ACh ao receptor RNACH e contração muscular

Uma vez liberada na fenda sináptica a ACh se liga ao receptor RNACH. Essa ligação promove a abertura de canais de sódio e conseqüente despolarização da membrana plasmática da fibra/célula muscular (sarcolema). A despolarização da sarcolema abre os canais de cálcio dependentes de voltagem e o aumento da concentração de cálcio intracelular é essencial para o encurtamento do sarcômero e respectiva contração muscular. O acoplamento do cálcio com a

troponina/tropomiosina é necessário para que ocorra liberação do sítio de ligação entre a actina (filamentos contráteis finos) e a miosina (filamentos contráteis grossos); uma vez os ligamentos contráteis ligados, há hidrólise do ATP e conseqüente deslizamento dos filamentos musculares contráteis grossos sobre os finos, promovendo, dessa forma, a contração dos sarcômeros com encurtamento das fibras musculares (GUYTON e HALL, 2006 a).

2.1.4.3 Inativação da ACh na fenda sináptica

Os receptores RNCAh continuam sendo ativados enquanto persistir a ACh na fenda sináptica, portanto esta deve ser removida rapidamente. Uma pequena quantidade de ACh difunde-se para fora da fenda sináptica, dispondo de pouco tempo para agir na membrana da fibra muscular (GUYTON e HALL, 2006). No entanto, a maior parte da ACh é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase que degrada a ACh em ácido acético e colina (BAILEY, 2006). A colina é transportada ativamente de volta a porção terminal pré-sináptica para ser utilizada novamente na síntese de ACh (GUYTON e HALL, 2006).

Cada excitação causada pela ACh deve ser rapidamente terminada para que a fibra muscular possa estar pronta para um próximo sinal (SHELTON, 2002). O pequeno tempo que a acetilcolina se mantém na fenda sináptica é suficiente para excitar a fibra muscular e sua rápida remoção evita a reexcitação continuada do músculo, depois que a fibra muscular se recuperou de seu potencial de ação (GUYTON e HALL, 2006).

Fatores que interferem no funcionamento do canal de cálcio na membrana pré-sináptica, na liberação de acetilcolina, na ligação da acetilcolina aos receptores na membrana pós sináptica ou degradação precoce de acetilcolina, podem resultar em transmissão sináptica inadequada e causar fraqueza muscular (SHELTON, 2002).

2.2 BOTULISMO

Botulismo vem do latim “botulus”, que significa salsicha (MEYER e EDDIE, 1998; CERESER ET. AL., 2008). O botulismo foi relatado pela primeira vez em 1793, com um surto na Alemanha, envolvendo 30 pessoas, com seis óbitos devido ao consumo de um tipo de salsicha defumada (CERESER ET. AL., 2008). Outros casos também foram relatados devido à ingestão de salsichas contaminadas, associado ao modo de preparo destas salsichas que eram feitas passando por um processo artesanal de fermentação (MEYER e EDDIE, 1998). Em 1897 na Bélgica, um surto de 24 casos associados à ingestão de presunto foi investigado por Emili Van Ermangem que conseguiu isolar o microorganismo *C. botulinum*, detectando sua toxina e determinando que a doença fosse mediada por esta (CERESER ET. AL., 2008).

Atualmente os alimentos mais comumente envolvidos são as conservas vegetais, principalmente as artesanais (palmito, pickles, pequi) (ASSUNÇÃO et al., 2005).

Botulismo é uma doença neuromuscular grave, não contagiosa, resultante da ação da potente toxina produzida pela bactéria anaeróbica *C. botulinum* (ASSUNÇÃO et al., 2005). A doença é observada principalmente em ruminantes, eqüinos e aves, mas há ocorrência em cães e outros carnívoros (NASCENTE et al., 2005); a ocorrência da doença em gatos também já foi relatada (GALEY et al., 2000; ELAD et al., 2004).

Animais que se alimentavam de cadáveres e alguns carnívoros eram considerados resistentes à toxina botulínica (ETTINGER e FEELDMAN, 1997). A suspeita de que cães poderiam ser acometidos pelo botulismo foi discutido por muito tempo (NASCENTE et al., 2005); porém, o primeiro registro deu-se somente em 1976, quando houve suspeita de um foco de botulismo em três cães Foxhound Americano que tiveram um surto de paralisia aguda após a ingestão de carne crua e parcialmente cozida; a toxina botulínica foi detectada no soro de um dos três cães que se recuperaram, e *C. Botulinum* que produz a neurotoxina tipo C foi detectado em uma amostra de carne restante (DARKE et al., 1976). Dois anos depois, em 1978, o diagnóstico de um surto de botulismo causado pela toxina tipo C em 19 cães Foxhound Americano utilizados na caça à raposa, no nordeste da Carolina do

Sul (EUA), não deixou dúvidas que os cães poderiam ser acometidos pela ação paralítica da toxina botulínica. Neste surto a toxina botulínica foi detectada no soro e nas fezes do cão mais severamente afetado e em extratos fecais dos demais animais enfermos, sendo que, a toxina botulínica pode ser neutralizada pela antitoxina botulínica tipo C em testes de inoculação em camundongos (BARSANTI et al., 1978; TROXEL, 2014). Atualmente, os casos em caninos têm sido atribuídos à ingestão de carnes cruas ou putrefeitas contendo a toxina pré-formada (ETTINGER e FEELDMAN, 1997; TROXEL, 2014).

2.2.1 TIPOS DE BOTULISMO

Três formas distintas de botulismo podem ocorrer, dependendo do modo de aquisição da toxina: botulismo alimentar, botulismo por ferimentos e botulismo intestinal (MEYER e EDDIE, 1998; SOBEL, 2005; LINDSTRON e KORKEALA, 2006).

2.2.1.1 Botulismo Alimentar

Ocorre por ingestão da neurotoxina presente em alimentos que foram previamente contaminados, produzidos ou conservados de maneira inadequada (SOBEL, 2005; CERESER et al., 2008). Os alimentos mais comumente envolvidos são: conservas vegetais, principalmente as artesanais (palmito, picles, pequi); produtos cárneos cozidos, curados e defumados de forma artesanal (salsicha, presunto, carne frita conservada em gordura – “carne de lata”); pescados defumados, salgados e fermentados; queijos e pasta de queijos e, raramente, em alimentos enlatados industrializados (ASSUNÇÃO et al., 2005). Na medicina veterinária os métodos mais comuns de ingestão da toxina pré-formada geralmente estão associados com consumo de carcaças ou matéria orgânica em decomposição (por exemplo, grão ensilados de forma inapropriada) e coprofagia (no caso de frangos de corte) (GALEY et al., 2000).

Dependendo da dose tóxica, a incubação pode variar entre um período de 12 a 72h (LINDSTROM e KORKELA, 2006), sendo que, quanto maior a concentração da toxina ingerida, menor o período de incubação (ASSUNÇÃO et al., 2005). Assim, após o período de incubação surge progressivamente os sinais, desde fraqueza até paralisia flácida (TROXEL, 2014).

Os casos naturais em cães têm sido atribuídos à ingestão de carne deteriorada ou carne crua (SHELTON, 2002). Açudes contaminados por toxinas de *C. botulinum* também constituem fontes de contaminação para cães de propriedades rurais (NASCENTE et al., 2005).

2.2.1.2 Botulismo por fermento

É ocasionado pela contaminação de fermentos com *C. botulinum*, e quando os fermentos fornecem condições de anaerobiose, a bactéria assume a forma vegetativa e produz a toxina (LINDSTROM e KORKELA, 2006). As principais portas de entrada para os esporos são úlceras crônicas com tecido necrótico, fissuras e fermentos em áreas profundas mal vascularizadas (ASSUNÇÃO et al., 2005).

Em seres humanos, o aparecimento de botulismo por fermentos pode ocorrer quando a porta de entrada é uma ferida produzida por agulhas (em usuários de drogas injetáveis) e lesões nasais ou sinusais (em usuários de drogas inalatórias) (LINDSTROM e KORKELA, 2006; SOBEL, 2005; CERESER et al., 2008). Na medicina veterinária, a incidência real de botulismo por fermentos não é conhecida, mas pode-se citar como exemplo a síndrome do potro bambo “(shaker foal)” ou cavalo bambo “(shaker horse)” nos casos de úlceras gastrintestinais ou outras feridas necróticas. Em potros, geralmente a idade de ocorrência é de 2 a 4 semanas, idade esta na qual o potro está mais vulnerável a ulceração gástrica (SWERZEK, 1980; GALEY et al., 2000). No cão, não há relatos de casos documentados com esta forma de botulismo.

Nos casos de botulismo por fermento, o período de incubação pode variar de 4 a 21 dias, tendo em média 7 dias (ASSUNÇÃO et al., 2005; LINDSTROM e KORKELA, 2006). O botulismo por fermentos é lembrado sempre que não se identifica uma fonte alimentar (ingestão de toxina botulínica no alimento previamente

contaminado), especialmente em casos isolados da doença. Ferimentos ou cicatrizes nem sempre são encontrados facilmente, devendo ser cuidadosamente investigados (ASSUNÇÃO et al., 2005). Em animais de pelame longo, quando suspeitos de botulismo por ferimento, faz-se necessária investigação meticulosa, que preferencialmente deve ser realizada após tricotomia do animal.

2.2.1.3 Botulismo Intestinal

Resulta da ingestão de esporos do *C. botulinum* presentes no alimento, seguida da fixação e multiplicação do agente no trato intestinal, onde ocorre a produção e absorção de toxina. A ausência da microbiota de proteção permite a germinação de esporos e a produção de toxina na luz intestinal. O período de incubação não é conhecido devido à impossibilidade de determinar o momento da ingestão dos esporos. Sendo que o período de incubação é maior porque a doença só tem início após a transformação do *C. botulinum* da forma esporulada para a forma vegetativa, que se multiplica e libera toxina. Períodos de incubação curtos sugerem maior gravidade e maior risco de letalidade (ASSUNÇÃO et al., 2005).

As condições no intestino humano normal não são favoráveis para germinação e vegetação de *C. botulinum*. Os esporos do *C. botulinum* são rotineiramente ingeridos e excretados por seres humanos, sem germinação, produção de toxinas ou qualquer dano à pessoa (SOBEL, 2005). As exceções são geralmente crianças (que desenvolvem o botulismo infantil, conhecido também como botulismo de lactantes; relacionado a síndrome da morte súbita em crianças) e adultos quando desenvolvem o botulismo toxêmico adulto (SOBEL, 2005; CERESER et. al., 2008).

Botulismo infantil geralmente afeta bebês menores de 1 ano de idade, tendo relatado o paciente mais jovem com apenas 54h de vida (LINDSTROM e KORKELA, 2006). Ocorre com maior frequência em crianças com idade entre 3 e 26 semanas – motivo pelo qual foi inicialmente denominado botulismo infantil (ASSUNÇÃO et al., 2005). Acredita-se que a colonização ocorre em bebês porque a microbiota intestinal normal que poderia competir e impedir a proliferação do *C. botulinum* não foi totalmente estabelecida (SOBEL, 2005).

A forma do botulismo adulto é rara, sendo resultado da colonização do trato intestinal pelo *C. botulinum* produzindo toxina, ocorre em pessoas com a microbiota intestinal alterada, podendo ser devido à cirurgia abdominal ou tratamento prolongado com agentes antimicrobianos (LINDSTROM e KORKELA, 2006).

Na medicina veterinária, o botulismo intestinal é conhecido nas aves (GALEY et al., 2000); no entanto, a ocorrência é desconhecida nas demais espécies animais. Hipoteticamente, essa forma pode ser suspeita sempre quando a doença for corretamente diagnosticada em pacientes que não tiveram acesso a alimento estragado ou em decomposição e ferimentos/cicatrizes recentes não forem observados no exame físico.

2.2.2 AGENTE ETIOLÓGICO – *C. BOTULINUM* E AS NEUROTOXINAS

2.2.2.1 *Clostridium Botulinum*

O agente etiológico consiste na neurotoxina pré formada produzida pela bactéria *C. botulinum* (FUJINAGA, 2009; TROXEL, 2014), sendo que quantidades pequenas da toxina são capazes de causar os sinais clínicos (NELSON e COUTO, 2010).

O *C. botulinum* são bacilos gram-positivos, anaeróbios e esporulados (ASSUNÇÃO et al., 2005; CERESER et. al., 2008; FERNANDEZ E BERNARDINI, 2010); retos a ligeiramente curvos, móveis com hastes anaeróbicas, apresentando 0,5-2,0 µm de largura e 1,6-22,0 µm de comprimento (MEYER e EDDIE, 1998).

Os esporos do *C. botulinum* são as formas mais resistentes que se tem encontrado entre os agentes bacterianos, podendo sobreviver por mais de 30 anos em meio líquido (CERESER et. al., 2008). Resistem a temperaturas de 120°C por 15 minutos (ASSUNÇÃO et al., 2005), portanto alimentos potencialmente contaminados devem ser aquecido por 30 minutos para destruição dos esporos (CERESER et. al., 2008). Além disso, os esporos de *C. botulinum* que originam a neurotoxina tipo E são capazes de germinar em temperaturas inferiores a 3°C, frequentemente esta

neurotoxina está relacionados com frutos do mar congelados (CERESER et. al., 2008).

Os esporos do *C. botulinum* são encontrados distribuídos na natureza, seja no solo, sedimentos de lagos e mares, produtos agrícolas (ASSUNÇÃO et al., 2005; CERESER et. al., 2008). O agente aparece também como habitante normal do trato intestinal de eqüinos (CERESER et. al., 2008), mamíferos, peixes (ASSUNÇÃO et al., 2005) e aves (NASCENTE et al., 2005; CERESER et. al., 2008), onde multiplica-se e é excretado em grande quantidade nas fezes por mais de oitos semanas após a primoinfecção (CERESER et. al., 2008).

As condições ideais para que a bactéria assuma a forma vegetativa (produtora de toxinas) são: anaerobiose, pH alcalino ou próximo do neutro (4,8 a 8,5) (ASSUNÇÃO et al., 2005; CERESER et. al., 2008), atividade de água de 0,95 a 0,97 e temperatura ótima de 37°C (ASSUNÇÃO et al., 2005).

A forma vegetativa do *C. botulinum* produz sete tipos de toxinas distintas sorologicamente (BRIN, 1997; ASSUNÇÃO et al., 2005; CERESER et. al., 2008), porém apresentam pesos moleculares semelhantes, possuem uma subunidade comum e são capazes de causar paralisia inibindo a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (BRIN, 1997). As neurotoxinas são classificadas em sorogrupos de A a G; sendo que, o tipo C possui dois subtipos o C1 e o C2 (ASSUNÇÃO et al., 2005).

O único denominador comum de todas as cepas é a capacidade de produzirem neurotoxinas que causam paralisia flácida. Cepas de *C. botulinum* formam quatro grupos de organismos distintos genotipicamente e fenotipicamente, designados I a IV. Fenotipicamente, as cepas I e II diferem entre si significativamente. Com base em suas características fenotípicas e genéticas, o grupo IV está prestes a ser renomeado *C. argentinense*, pois foi isolado no solo da Argentina (LINDSTROM et al., 2001; LINDSTROM e KORKELA, 2006; MEDICI et al., 2009).

Culturas do grupo I produzem a toxina A, B, ou F e culturas do grupo II produzem a toxina B, E, ou F. Outros *Clostridium*, nomeados de *C. butyricum* e *C. baratii*, também são conhecidos por produzirem toxinas E e F, respectivamente. O grupo III parece estar relacionado com a produção das toxinas C e D, já a toxina G parece ser produzida pelo grupo IV (LINDSTROM et al., 2001; LINDSTROM e KORKELA, 2006; MEDICI et al., 2009).

Geralmente as cepas de *C. Botulinum* produzem um único tipo de toxina; no entanto cepas produtoras de dois tipos distintos de toxinas também já foram relatadas, assim como cepas diferentes que produzem um mesmo tipo de toxina, embora carregem genes silenciosos para produção de outras toxinas. (LINDSTROM et al., 2001; LINDSTROM e KORKELA, 2006; MEDICI et al., 2009).

2.2.2.2 Neurotoxina - Toxina Botulínica

As toxinas de A a G se diferenciam por suas características fenotípicas, como o grau de termorresistência, antigenicidade, perfil bioquímico e letalidade para as diferentes espécies animais (LINDSTROM et al., 2005).

A dose letal para humanos de neurotoxina botulínica na ingestão não é conhecida (BRIN, 1997; CERESER et. al., 2008). Porém, é estimada através dos resultados encontrados para primatas, acreditando-se que para um homem de 70 kg a dose letal para toxina do tipo A seja igual a 0,09 – 0,15 ng por via endovenosa ou intramuscular, de 0,70 – 0,90 ng por inalação, e 70ng por via oral (CERESER et. al., 2008; MEDICI et al., 2009). Sabe-se que um grama de toxina botulínica é o suficiente para matar 30 milhões de camundongos (CERESER et. al., 2008).

Diferentemente do *C. Botulinum* que é termorresistente, a toxina é mais vulnerável ao calor. Temperatura de 85°C por 5 minutos é capaz de inativar todos os tipos de toxinas (SOBEL, 2005), porém, são sensíveis a luz solar por mais de 3 horas e a temperatura ambiente por mais de 12 ou 20 horas (BRIN, 1997).

A molécula da toxina botulínica é secretada pelo *Clostridium* como toxina progenitora, que contém a neurotoxina paralítica ligada de forma não covalente com proteínas não-tóxicas (BARSANTI, 2006; HENKEL et al., 2009; HIRAI, 2011). A toxina progenitora é muito estável a pH baixo, protegendo a neurotoxina de um ataque proteolítico no ambiente gástrico, permitindo alcançar o intestino delgado, no qual o pH alcalino conduz à dissociação do complexo, libertando a neurotoxina, o que explica a razão da toxina progenitora ser mais tóxica do que a neurotoxina sozinha quando administrado oralmente (BARSANTI, 2006). A toxina progenitora pode estar associada com macromoléculas, tais como proteínas, ácidos nucleicos e hemaglutinina (esta realiza associação não covalente) (BARSANTI, 2006).

A hemaglutinina facilita o transporte da toxina progenitora da barreira intestinal para a circulação sistêmica, auxiliando na absorção da neurotoxina pelo organismo (HENKEL et al., 2009; HIRAI, 2011). O número e tamanho de proteínas não tóxicas associadas diferem entre os tipos de toxina, a neurotoxina tipo C pode estar associada com até cinco proteínas, resultando num complexo de tamanho molecular de 500 ou 900 kDa (BARSANTI, 2006).

A neurotoxina botulínica é uma cadeia única de polipeptídeos com 150 kDa de peso molecular. Nesta forma, as moléculas de toxina tem relativamente pouca potência como bloqueadores neuromusculares (BRIN, 1997). Para que ocorra a ativação neurotóxica, ocorrem modificações na estrutura da toxina; a cadeia original é clivada em duas subunidades ligadas por uma ligação covalente dissulfeto, cadeia pesada (*Chain Heavy*, HC) e a cadeia leve (*Light Chain*, LC) (BRIN, 1997; BÖHNEL e GESSLER, 2005; LINDSTROM e KORKELA, 2006; FUJINAGA, 2006; HENKEL et al., 2009; HIRAI, 2011).

A cadeia pesada (*Chain Heavy*, HC) com aproximadamente 100 kDa de peso molecular, é composta por dois domínios funcionais (domínio amino-terminal e domínio carboxi-terminal) envolvidos no reconhecimento de receptores específicos e translocação da cadeia leve através da membrana sináptica endossomal. A cadeia leve (*Light Chain*, LC) é uma metaloprotease de zinco de aproximadamente 50 kDa de peso molecular. Essa cadeia peptídica tem em sua estrutura espaçamentos característicos ocupados por determinados aminoácidos ligantes de zinco, sendo capaz de clivar as proteínas envolvidas na ligação/fusão da vesícula de acetilcolina com a membrana pré-sináptica (BRIN, 1997; BÖHNEL e GESSLER, 2005; LINDSTROM e KORKELA, 2006; FUJINAGA, 2006; HENKEL et al., 2009; HIRAI, 2011).

2.2.3 EPIDEMIOLOGIA

Geralmente, as cepas de *C. botulinum* pertencentes aos grupos I e II (neurotoxinas B, E e F) causam enfermidade nos seres humanos, enquanto as cepas do grupo III (neurotoxinas C e D) estão envolvidas com o botulismo animal, mas exceções podem ocorrer (LINDSTROM et al., 2001; LINDSTROM e KORKELA,

2006; MEDICI et al., 2009). O grupo IV (neurotoxina G) (LINDSTROM et al., 2001; LINDSTROM e KORKELA, 2006; MEDICI et al., 2009) foi associada a alguns casos de morte súbita em humanos (CERESER et. al. 2008).

Organismos do grupo I parecem ser mais de origem terrestre e estão presentes em climas temperados, enquanto que os organismos do grupo II, particularmente do grupo das neurotoxinas botulínicas E, são freqüentemente encontrados em ambientes aquáticos no hemisfério norte. O grupo III parece ser de origem terrestre e é encontrado em climas variados (temperado a tropical), com distribuição mundial. O grupo IV (*C. argentinense*), até agora foi isolado na América do Sul, especificamente do solo da Argentina. As diferenças na resistência ao calor e temperaturas de crescimento dos esporos, são responsáveis pelos riscos de segurança levantados por grupos de *C. botulinum* I e II na indústria de alimentos; os esporos do grupo I, têm uma alta resistência ao calor, causando problemas em enlatados e conservas caseiras de legumes e carnes; enquanto que os esporos do grupo II, menos resistentes ao calor, são de grande preocupação para os alimentos embalados minimamente processados que têm uma vida útil prolongada em temperaturas refrigeradas (LINDSTROM et al., 2001; LINDSTROM e KORKELA, 2006; MEDICI et al., 2009).

As toxinas de A a G tem diferentes índices de morbidade e letalidade para as diferentes espécies acometidas e um certo nível de especificidade por hospedeiro têm sido atribuída a cada uma das toxinas (BRIN, 1997; ELAD et al., 2004; LINDSTROM et al., 2001; CERESER et. al., 2008).

As neurotoxinas botulínicas dos tipos A, B, E e F são os principais tipos associados ao botulismo humano (LINDSTROM et al., 2001; CERESER et. al., 2008). Os quadros de botulismo mais prevalente em herbívoros (equino e bovino) estão associados com as neurotoxinas do tipo B (mais raro em bovinos, associado principalmente a alimentação com silagem contendo grãos estragados por mau acondicionamento durante a fermentação) e D (associado a bovinos). Já a neurotoxina do tipo C é mais prevalente em aves, porém também tem sido relacionado em surtos de botulismo em herbívoros (equinos e bovinos que acidentalmente ingerem alimento contaminado com carcaças) e raramente é associada com botulismo em carnívoros. A neurotoxina do tipo C1 é comum acometer patos selvagens, faisões e frangos, e a toxina do tipo C2 em bovinos e equinos (GALEY et al., 2000; ELAD et al., 2004; NASCENTE et al., 2005). A toxina

tipo G não foi envolvido em nenhum surto de botulismo, seja no homem ou em animais (NASCENTE et al., 2005), porém de acordo com Cereser et. al., (2008) está associado a alguns casos de morte súbita.

Embora o tipo C seja raramente encontrado em carnívoros, há relatos confirmados de infecção com a toxina C1 em cães (SHELTON, 2002) e em gatos (ELAD et al., 2004; GALEY et al., 2000). Todos os relatos de casos de botulismo em cães estão relacionados com a neurotoxina botulínica C1 (SHELTON, 2002; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010; TROXEL, 2014), com exceção de dois casos relacionados a neurotoxina tipo D, relatados no Senegal (DOUTRE, 1982 e 1983).

2.2.4 PATOGENIA

Ingestão de toxinas pré-formadas leva ao desenvolvimento do botulismo, sendo que, quanto maior a quantidade de neurotoxina ingerida mais severos serão os sinais clínicos (SHELTON, 2002). As neurotoxinas botulínicas atuam na JNM impedindo a liberação de ACh pelo neurônio pré-sináptico, com exceção da toxina C2 que age nas membranas provocando mudanças na permeabilidade da membrana (GALEY et al., 2000). As toxinas botulínicas são as mais potentes conhecidas, estas não atingem o sistema nervoso central devido a barreira hematoencefálica, não ocorrendo perturbações neurológicas de ordem central, desta forma o paciente comumente permanece consciente durante a evolução do quadro (CERESER et. al., 2008).

As toxinas ingeridas são absorvidas no estômago e na primeira porção do intestino delgado (NASCENTE et al., 2005; JIN et al., 2009; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010), atravessando a barreira epitelial do trato gastrointestinal e distribuindo-se pela corrente sanguínea até a junção neuromuscular, local onde ligam-se a receptores celulares específicos e penetram nas células nervosas (NASCENTE et al., 2005; JIN et al., 2009).

O mecanismo detalhado pelo qual a toxina botulínica atravessa a barreira epitelial intestinal e entra na circulação ainda não está totalmente esclarecido (JIN et al., 2009). Dados sugerem que a toxina botulínica entra na terminação nervosa através de um receptor lisossomal de vesículas realizando endocitose, processo

este que não depende da concentração de íon Ca^{+} , mas depende de energia e da estimulação do nervo (BRIN, 1997)

O complexo toxina botulínica (toxinas progenitoras) é composto de uma única molécula de neurotoxina, uma única molécula não-tóxica de composto não hemaglutinante (NTNHA), e um complexo de hemaglutinina (HA). No botulismo de origem alimentar, componentes atóxicos têm as funções de proteger a toxina da degeneração e degradação pela ação de ácidos e proteases existentes no trato gastrointestinal. A HA facilita o transporte quando a toxina progenitora atravessa a barreira intestinal epitelial para entrar na circulação sistêmica (HIRAI, 2011). Dessa forma, a HA é um fator patogênico importante que viola a defesa do hospedeiro por interação com o epitélio intestinal no botulismo de origem alimentar (JIN et al., 2009).

As toxinas botulínicas dos tipos A, B e C têm potente capacidade de interromper a função da barreira epitelial via HA facilitando a entrada das toxinas (JIN et al., 2009). Por outro lado, carreadores de ocorrência natural nos alimentos, tais como aglutinina de gérmen de trigo, digitonina ou saponina, e toxinas bacterianas, como a estreptolisina O, perfringolisinas, toxina C2 ou botulinolisina, também podem favorecer e facilitar a entrada de toxinas botulínicas em células que podem não ter receptores naturais de ligação através da formação de poros na parede celular (BÖHNEL e GESSLER, 2005).

Uma vez presente na circulação sistêmica, a neurotoxina desassocia dos complexos de toxinas (toxinas progenitoras sofrem divisão formando a cadeia leve e a cadeia pesada) (HIRAI, 2011) e se distribui no organismo alcançando a JNM.

Depois que as toxinas botulínicas (neurotoxinas) chegam à JNM (terminação nervosa periférica), estas sofrem endocitose em vesículas lipídicas (vesículas sinápticas). A porção carboxiterminal da cadeia pesada é a responsável pela ligação neuroespecífica através da interação com os receptores gangliosídeos e fosfatidiletanolamina do neurônio pré-sináptico, favorecendo a endocitose da toxina. Já a porção aminoterminal da cadeia pesada é responsável pela translocação da cadeia leve para o citosol do neurônio (FUJINAGA, 2009). A cadeia leve é liberada no citosol de uma célula nervosa por meio de um evento de translocação através da membrana fosfolipídica das vesículas. A cadeia leve das toxinas botulínicas decompõem as principais proteínas envolvidas no tráfego e liberação de neurotransmissores (ACh), incluindo sinaptobrevina, SNAP-25, e syntaxina. Estas

proteínas sinápticas compostas pelos membros do complexo SNARE [soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusionprotein) attachment protein] têm um papel central nos eventos de fusão de membrana. Dessa forma, a proteólise seletiva destas proteínas SNARE inibe a liberação de neurotransmissores dos neurônios (HIRAI, 2011) por impedir o funcionamento das proteínas necessárias para exocitose.

Uma vez no citosol, a cadeia leve da neurotoxina botulínica C, que consiste em uma endopeptidase de zinco, cliva as proteínas SNAP-25 e sintaxina encontradas na porção interna da membrana plasmática do neurônio pré-sináptico. Já a cadeia leve da neurotoxina D cliva a proteína sinaptobrevina que está localizada na vesícula de Ach. Em ambos os casos não permitindo a ligação/ fusão com as proteínas da membrana plasmática terminal, impedindo a exocitose da vesícula de ACh (FUJINAGA, 2009).

O impedimento no processo de fusão de vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica bloqueia a exocitose das vesículas repletas de neurotransmissores, impedindo a liberação de acetilcolina na fenda sináptica, causando a paralisia flácida (JIN et al., 2009).

A ligação da toxina botulínica aos receptores neuronais ocorre de forma rápida e durante este estágio, a toxina é suscetível a inativação pela antitoxina, não resultando em paralisia. Porém quando dentro da célula é resistente a inativação por antitoxina (MENDES, 2008).

A potência máxima das neurotoxinas botulínicas é alcançada apenas após a ativação enzimática, que provavelmente está relacionada à clivagem da molécula da toxina. Geralmente, nas cepas proteolíticas de *C. botulinum* do grupo I, isso é feito por enzimas endógenas do microorganismo, mas neurotoxinas produzidas por cepas não-proteolíticas do grupo II pode exigir proteases externas, tais como a tripsina, para a ativação (LINDSTROM e KORKELA, 2006).

2.2.5 SINAIS CLÍNICOS

Em todas as espécies, o botulismo é caracterizado pela capacidade da neurotoxina causar disfunção generalizada de neurônio motor inferior (NMI) (BARSANTI, 2006; TROXEL, 2014), que ocorre através do impedimento da liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (NASCENTE et al., 2005) levando a fraqueza e paralisia flácida (BARSANTI, 2006; TROXEL, 2014).

O período de incubação da neurotoxina progenitora após a ingestão de alimentos contaminados pode variar de horas até 6 dias (BARSANTI, 2006; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010); assim, podendo ocorrer o início dos sinais 24 a 48h (NASCENTE et al., 2005), até 6 dias após a ingestão da toxina (BARSANTI, 2006; NASCENTE et al., 2005; QUESNEL, 2008). A severidade dos sinais clínicos varia de acordo com a quantidade de toxina ingerida e a susceptibilidade do animal (BARSANTI, 2006; MONEGO et. al., 2006; MENDES, 2008; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010; NELSON e COUTO, 2010). Portanto, quanto mais cedo os sinais aparecerem, provavelmente mais grave será a doença (BARSANTI, 2006).

Os sinais clínicos em cães com botulismo causado pela neurotoxina tipo C são os mesmos, independente se a intoxicação ocorreu de forma experimental ou natural (BARSANTI, 2006).

Dependendo da gravidade da intoxicação, o animal pode apresentar diferentes quadros clínicos; desde sinais mais brandos com uma instabilidade ao movimentar e fraqueza ascendente (evoluindo de membros posteriores até membros anteriores), simétrica e progressiva, até prostração profunda e paralisia flácida generalizada ou mesmo tetraplegia (BARSANTI, 2006; SILVA et al., 2008; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010).

Devido a fraqueza muscular, os cães acometidos geralmente apresentam intolerância ao exercício, apresentando marcha de passos curtos e deslizantes (OLBY, 2004; NASCENTE et al., 2005; COSTA et al., 2006; QUESNEL, 2008; NELSON e COUTO, 2010). Em casos mais graves, a paralisia pode atingir a musculatura diafragmática e os músculos intercostais, causando grave dispnéia que pode levar a óbito (MEYER e EDDIE, 1998; NASCENTE et al., 2005; DALMOLIN et al., 2008; NELSON e COUTO, 2010; TROXEL, 2014).

Ao exame neurológico é comum observar perda do tônus muscular (hipotonia) e reflexos espinhais diminuídos (hiporreflexia) ou ausentes (arreflexia), mas não há atrofia muscular (BARSANTI, 2006; COSTA et al., 2006; SALVARANI et al., 2008; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010; NELSON e COUTO, 2010; TROXEL, 2014) e a movimentação da cauda é preservada (BARSANTI, 2006; NELSON e COUTO, 2010).

Em quadros de botulismo a percepção da dor é normal, não apresentando hiperestesia a flexão, alongamento ou palpação da musculatura (BARSANTI, 2006; NELSON e COUTO, 2010) diferente de animais com disfunção generalizada de NMI e fraqueza causada por doenças inflamatórias como polirradiculoneurite e polimiosite (BARSANTI, 2006).

É comum o acometimento de nervos cranianos (OLBY, 2004; SOBEL, 2005; NASCENTE et al., 2005; BARSANTI, 2006; NELSON e COUTO, 2010; TROXEL, 2014). A paralisia da musculatura ocular ocorre devido a paralisia dos nervos cranianos III (oculomotor), IV (troclear) e VI (abducente) (SOBEL, 2005), e manifesta-se como incapacidade de acomodar a visão de perto, perda do reflexo pupilar a luz, dilatação pupilar (midríase), perda da retração ocular (NELSON e COUTO, 2010), e estrabismo (DALMOLIN et al., 2008). Paralisia do VII nervo craniano (facial), produz fraqueza dos músculos faciais causando assimetria na expressão facial e diminuição do tônus mandibular. A disfagia é causada pela paralisia do IX par de nervo craniano (glossofaríngeo), podendo apresentar regurgitação e dificuldade em apreender o alimento (SOBEL, 2005; NASCENTE et al., 2005). Envolvimento do nervo laríngeo pode causar uma alteração ou perda de voz (disfonia ou afonia) e aumento de ruídos inspiratórios (estridor) (OLBY, 2004).

A regurgitação pode também ser decorrente do desenvolvimento de megaesôfago (OLBY, 2004; COSTA et al., 2006; DALMOLIN et al., 2008; SALVARANI et al., 2008; NELSON e COUTO, 2010), e os refluxos resultantes podem levar à pneumonia por aspiração, principalmente se os músculos da faringe e laringe estiverem afetados (OLBY, 2004). Podem apresentar também, retenção urinária e constipação (MEYER e EDDIE, 1998; BARSANTI, 2006; MENDES, 2008). Conjuntivite e ceratite ulcerativa podem surgir como resultado dos reflexos palpebrais reduzidos, e ceratoconjuntivite seca pode ser observada devido a diminuição da produção lacrimal (NASCENTE et al., 2005; BARSANTI, 2006; TROXEL, 2014).

Os cães acometidos podem ter sialorréia, tosse, (COSTA et al., 2006; DALMOLIN et al., 2008; SALVARANI et al., 2008; URIARTE et al., 2010), bradicardia e bradipnéia (NASCENTE et al., 2005; BARSANTI, 2006).

A duração da enfermidade nos cães que se recuperam tem variado de uma a três semanas (ETTINGER e FEELDMAN, 1997; DALMOLIN et al., 2008). Apresentando em média 14 dias (FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010).

Nos casos de botulismo de origem alimentar alguns sintomas gastrointestinais, como náuseas e vômitos podem aparecer antes dos sinais neurológicos. É desconhecido se estes sintomas são causados por ação direta da toxina botulínica C subtipo C1 ou outros contaminantes no alimento estragado (SOBEL, 2005).

Alguns cães morrem repentinamente com sinais generalizados de hemorragia e sem déficits neurológicos. Estes sinais são causados provavelmente pela neurotoxina C subtipo C2 que aumenta a permeabilidade vascular induzindo hemorragia e edema (ANDRADE, 2005; BARSANTI 2006) ao invés da paralisia flácida (ANDRADE, 2005). Sinais gastrointestinais podem também estar relacionado a toxina C subtipo C2, causando diarreia por aumentar a permeabilidade de fluido através das membranas (GALEY et al., 2000).

Gatos demonstram paralisia difusa de NMI semelhante aos cães, levando a óbito em casos mais graves, enquanto nos casos mais brandos, ocorre a recuperação em até 56 horas (TROXEL, 2014).

2.2.6 DIAGNÓSTICO

O botulismo é uma doença que oferece risco a vida do paciente, portanto um diagnóstico rápido é necessário para uma terapia bem sucedida (SOBEL, 2005; LINDSTROM e KORKEALA, 2006). Enquanto o teste de inoculação em camundongos se mantém como o teste padrão para a detecção de neurotoxinas botulínicas, ocorreu grandes progressos no desenvolvimento de testes alternativos durante a última década (LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

Exames laboratoriais de rotina tais como hemograma completo, perfil bioquímico e urinálise, estarão dentro dos limites de referência (em um paciente livre

de outras doenças ou infecções secundárias). O fluido cerebro espinhal é normal em pessoas e cães afetados. As radiografias torácicas podem mostrar megaesôfago em cães (BARSANTI, 2008).

Confirmação do diagnóstico de botulismo é baseada na constatação da toxina no soro, fezes, vômito, ou em amostras de o alimento que foi ingerido. O soro deve ser coletado o mais rápido possível e quando os sinais clínicos estiverem no apice (BARSANTI, 2008). Aproximadamente 10 ml de soro, 50 g de fezes, vômitos, ou alimentos são necessários para conduzir testes de diagnóstico (ASSUNÇÃO et al., 2005; BARSANTI, 2008). Para caso suspeito de botulismo por feridas, as amostras devem incluir 10 ml de material da ferida; em casos de botulismo intestinal infantil, a fezes é o material de predileção (SOBEL, 2005). As amostras devem ser refrigeradas e examinadas o mais rapidamente possível. O congelamento não afeta a toxina, mas afeta a capacidade de detectar o organismo, portanto congelamento deverá ocorrer apenas quando houver previsão de demora de dias para análise (BARSANTI, 2008).

Quando as amostras forem enviadas para um laboratório distante, devem ser colocadas em recipientes estéreis, à prova de vazamento e recipientes isolados com líquido de arrefecimento. O recipiente deve receber a marcação de produto biológico de perigo potencial (BARSANTI, 2008).

2.2.6.1 Diagnóstico Bacteriológico

A detecção do *C. botulinum* em amostras (fezes, conteúdo gástrico, conteúdo intestinal e swab de feridas e tecido) de pacientes, apoia o diagnóstico, porém não deve ser exclusivamente considerado como positivo para a doença (BALDASSI et al., 1991; SOBEL, 2005; LINDSTROM e KORKEALA, 2006), uma vez que o esporo pode ser encontrado normalmente no trato gastrintestinal de animais sadios (NASCENTE et al., 2005; SILVA et al., 2008; BARSANTI, 2008).

2.2.6.1.1 Métodos de cultura para *C. botulinum*

Para a cultura do *C. botulinum*, em caso de botulismo intestinal, pode ser utilizado fezes ou conteúdo intestinal; no caso de botulismo por fermento é usado exsudato do fermento; já no caso de botulismo alimentar é aconselhável a realização de outro teste diagnóstico (ASSUNÇÃO et al., 2005).

Componentes de amostras como fezes, sangue, pus e alimentos podem interferir causando reações nos testes. Altas concentrações de patógenos em amostras pode retardar o crescimento *C. botulinum* e da produção de toxinas. Várias sequências de cultura são necessárias para isolar uma cultura pura e muitas vezes ocorre falha no isolamento (LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

O *C. botulinum* requer condições anaeróbicas estritas para o crescimento, criando desafios para o trabalho em laboratório com o microrganismo. Agentes redutores podem ser adicionados para manter a anaerobiose durante a cultura e incubação, e todo material deve ser desoxigenado antes do contato com culturas de *C. botulinum* (LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

Detecção convencional e isolamento de *C. botulinum* são baseados em cultivo em meio líquido e detecção subsequente de toxina botulínica no sobrenadante da cultura através de bioensaio em camundongos. Anticorpos fluorescentes contra a parede da célula vegetativa de *C. botulinum* também têm sido utilizados para confirmação da cultura, porém este método pode apresentar reatividade cruzada podendo levar a falso-positivo. A identificação do *C. botulinum* nos tubos de cultura pode também ser confirmado por provas de biologia molecular como a PCR (polimerase chain reaction) (ASSUNÇÃO et al., 2005; LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

2.2.6.1.2 Detecção molecular de *C. botulinum*

A maioria dos trabalhos sobre o uso da PCR para detecção do ácido nucleico do *C. botulinum* são baseados em detecção do gene ou partes do gene codificante de uma única toxina. Porém, tem sido desenvolvidos métodos de multiplex – PCR

que permitem a detecção simultânea dos genes de toxinas A, B, E e F em uma única reação (LINDSTROM et al., 2001; MEDICI et al., 2009).

A sensibilidade da PCR relatada para detecção de *C. botulinum* nas fezes e amostras de alimentos variam consideravelmente (LINDSTROM e KORKEALA, 2006). Os materiais submetidos à técnica de PCR são amplos e incluem alimentos, amostras clínicas (fezes, vômito, tecido), e até mesmo amostras ambientais (solo) (MEDICI et al., 2009).

Alguns componentes em amostras clínicas e de alimentos, tais como sais biliares, microbiota nas fezes, imunoglobulinas e outros componentes do sangue, proteína e gordura nos alimentos podem inibir a PCR ou diminuir a sua sensibilidade (LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

A sensibilidade da PCR pode ser aumentada por uma estratégia de amplificação do tipo *nested-PCR*, onde dois conjuntos de primers direcionados para o mesmo gene são utilizados na reação. *C. botulinum* que produz a neurotoxina tipo B foi detectado com sucesso diretamente de fezes de um caso de botulismo intestinal infantil ao usar um reação de *nested-PCR* (LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

Embora a PCR seja uma ferramenta de triagem poderosa no diagnóstico laboratorial de surtos de botulismo, os resultados devem ser confirmados por outros métodos; devido a PCR não detectar a neurotoxina botulínica e sim o gene bacteriano responsável pela codificação das informações necessárias para a síntese da toxina (LINDSTROM et al., 2001; BARSANTI, 2008; LINDSTROM e KORKEALA, 2006; MEDICI et al., 2009).

2.2.6.1.3 Caracterização genética de *C. botulinum*

A tipagem molecular tem sido utilizada para a caracterização genética do *C. botulinum*, existindo bibliotecas moleculares internacionais com impressões digitais genéticas, obtidas através de seqüenciamento de DNA, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e ribotipagem, juntamente com técnicas baseadas em PCR como polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), e PCR baseada em

seqüências de elementos repetitivos (Rep-PCR). Os métodos utilizados produzem um padrão de impressões digitais genômicas distintas para cada bactéria. Estas impressões digitais consistem de 5 a 15 fragmentos na faixa de tamanho de 10 a 1000 kbp, podendo ser usadas para rastrear a origem de surtos pela comparação genética do *C. botulinum* previamente isolados de pacientes e alimentos suspeitos com os do banco genético (LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

2.2.6.2 Diagnóstico Toxicológico

A confirmação de botulismo ocorre através da detecção da toxina presente no soro do paciente, secreção gátrica ou fezes (BALDASSI et al., 1991; NASCENTE et al., 2005; SOBEL, 2005; QUESNEL, 2008; SILVA et al., 2008; NELSON e COUTO, 2010; URIARTE et al., 2010). A toxina ingerida não é detectada no soro após 11 semanas da exposição a mesma, porém pode ser encontrada nas fezes por um período maior (SOBEL, 2005; URIARTE et al., 2010).

Para detecção da toxina botulínica em caso de botulismo alimentar, pode ser usado material como soro, fezes, conteúdo intestinal e lavado gástrico. No caso de botulismo intestinal pode ser usado soro, fezes e conteúdo intestinal. Já no caso de botulismo por ferimento, pode ser usado amostras de soro ou de exsudato do ferimento (ASSUNÇÃO et al., 2005).

A coleta de amostras clínicas (soro, lavado gástrico, fezes/contéudo intestinal, exsudato de ferimento) deve ser realizada o mais precocemente possível e anteceder a administração do soro antitoxinotico, para evitar que a toxina ativa seja neutralizada antes da coleta (ASSUNÇÃO et al., 2005; BARSANTI, 2008). A coleta tardia pode impedir a detecção de toxina, pois ela vai sendo absorvida pelos tecidos em função do tempo (ASSUNÇÃO et al., 2005). O procedimento padrão para a detecção de toxina botulínica é o ensaio de letalidade em camundongos (diagnóstico biológico) (GALEY et al., 2000; SOBEL, 2005; BARSANTI, 2008).

Para o transporte, as amostras devem ser acondicionadas e conservadas a uma refrigeração de 4°C a 8°C, pois a toxina botulínica é termolábil, podendo ser inativada em temperaturas acima da ambiental (ASSUNÇÃO et al., 2005; BARSANTI, 2008). Exceção aos casos de botulismo por ferimento, cuja amostras de

exsudato devem ser enviada em temperatura ambiente, e o tempo do transporte não deve ultrapassar 48 horas (ASSUNÇÃO et al., 2005).

O procedimento imunoenzimático ELISA é uma alternativa para a detecção da toxina botulínica, porém componentes dos alimentos podem diminuir a sensibilidade do teste (LINDSTROM e KORKEALA, 2006; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010), obtendo resultados falso-negativo (FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010). Este teste pode servir como uma triagem inicial em casos de suspeita de botulismo, e em casos negativos confirmar o resultado com bioensaio em camundongos (LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

Um ensaio de PCR multiplex para a detecção simultânea e identificação de tipos de neurotoxinas A, B, E e F em alimentos e material clínico foi desenvolvido; o método é baseado em quatro novos pares de primers específico para detectar o tipo de *C. botulinum* produtor das neurotoxinas botulínicas (LINDSTROM et al., 2001; BARSANTI, 2008; MEDICI et al., 2009).

2.2.6.3 Diagnóstico Biológico

2.2.6.3.1 Ensaio de letalidade em camundongo

O teste consiste em inoculação intraperitoneal em camundongos, contendo amostras suspeitas diluídas em tampão fosfato (ASSUNÇÃO et al., 2005; NASCENTE et al., 2005; SOBEL, 2005; GALEY et al., 2006; QUESNEL, 2008; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010). Se a amostra contém a toxina, os camundongos passam a desenvolver sinais típicos do botulismo (SHELTON, 2002; LINDSTROM e KORKEALA, 2006; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010), tais como fraqueza muscular, pêlos arrepiados e angustia respiratória, sinais esses que manifestam-se nos camundongos por um acinturamento típico chamado como cintura de vespa (estreitamento da cintura) (SHELTON, 2002; LINDSTROM e KORKEALA, 2006). Estes sinais clínicos geralmente desenvolvem-se dentro de um dia após a inoculação intraperitoneal, mas podem levar vários dias para aparecerem

os sinais, variando até aproximadamente 3 dias após a inoculação (SOBEL, 2005; LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

O tipo da toxina pode ser determinada pela neutralização da mesma com antitoxinas específicas. Nessa prova, os camundongos injetados sobrevivem devido a neutralização da toxina pela antitoxina, enquanto os outros desenvolvem o botulismo (SHELTON, 2002; NASCENTE et al., 2005; SOBEL, 2005; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010). Como método alternativo, a amostra pode ser tratada com antitoxina antes da administração intraperitoneal, podendo desta forma diagnosticar o tipo de toxina (LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

O bioensaio em camundongos é um método muito sensível. Em laboratórios de microbiologia clínica, este teste têm sido usado com amostras fecais, de soro, conteúdo gástrico e amostras do alimento. Ainda pode-se usar amostras do sobrenadantes de culturas de *C. botulinum* para confirmação (BALDASSI et al., 1991; LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

2.2.6.3.2 Ensaio não letal em camundongos

Outro tipo de ensaio com camundongos tem sido explorado para testar a potência das neurotoxinas botulínicas para uso terapêutico; nesse caso, o desfecho não é a morte e sim paralisia muscular local como resultado de inoculação subcutânea de toxina botulínica tipo A. O ensaio não-letal em camundongos é igual ao bioensaio convencional em sensibilidade e especificidade, mas não causa sinais de angústia respiratória ou movimentos prejudicados nos animais. No entanto, o ensaio tem sido alvo de testes de potência de neurotoxinas purificadas, e por isso não foi validado para laboratórios de microbiologia para a investigação de amostras complexas (LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

2.2.6.4 Diagnóstico Presuntivo

O diagnóstico presuntivo não é difícil quando se tem uma forte suspeita para botulismo, como por exemplo quando ocorre um surto por ingestão de um mesmo alimento. Porém, na maioria das vezes, os casos ocorrem separadamente, o que pode representar uma grande dificuldade para o diagnóstico presuntivo (MEYER e EDDIE, 1998). Deve-se pensar em botulismo sempre que aparecer sinais parassimpáticos junto com paralisia flácida generalizada, progressiva e extensa (URIARTE et al., 2010; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010).

A administração de antitoxina é a única terapia específica disponível para botulismo, e só tem eficácia se dado no início do curso da disfunção neurológica. Portanto, o diagnóstico desta doença não pode aguardar o resultado de exames que possam ser demorados, e ser de confirmação somente em alguns casos (MEYER e EDDIE, 1998), devendo assim, realizar o diagnóstico presuntivo do botulismo com base no histórico, exame físico e exame neurológico do paciente (MEYER e EDDIE, 1998; TROXEL, 2014).

É necessário a realização de uma anamnese cuidadosa, buscando identificar fatores de risco específicos para botulismo. Deve-se avaliar o início e a progressão dos principais sinais neurológicos apresentados. Na suspeita de botulismo alimentar, também devem ser verificados: alimentos ingeridos nos últimos 3 a 10 dias; tempo decorrido entre a ingestão e o aparecimento da doença; existência de outros casos e fonte comum de ingestão (ASSUNÇÃO et al., 2005; BARSANTI, 2008). De forma geral, prevalecem os sinais e sintomas neurológicos, sendo estes os primeiros e mais importante achados ao se examinar o paciente (ASSUNÇÃO et al., 2005).

Baseado nas alterações clínicas e no histórico de ingestão de alimento estragado se faz o diagnóstico presuntivo de botulismo; e é especialmente provável se um surto de paralisia relacionada com disfunção de NMI for observado em um grupo de cães (OLBY, 2004; NELSON e COUTO, 2010; TROXEL 2014).

2.2.7 TRATAMENTO

Durante as primeiras décadas do século XX, nos EUA, a taxa de mortalidade entre pacientes humanos com botulismo era de 60% - 70%. Durante o final dos anos 1940 e 1950, a taxa de mortalidade diminuiu drasticamente, até chegar à taxa atual de 3% - 4% de óbitos. A diferença resultou, em grande parte, devido a técnicas de terapia intensivas, incluindo ventilação mecânica (SOBEL, 2005).

O êxito da terapêutica do botulismo está diretamente relacionado à precocidade com que é iniciada e às condições do local onde será realizada (ASSUNÇÃO et al., 2005).

O tratamento para botulismo, tanto para humanos quanto para os animais, consiste em um tratamento suporte (não específico), e um tratamento específico que consiste na administração da antitoxina botulínica (SAB) (SILVA et al., 2000; SHELTON, 2002; OLBY, 2004; NASCENTE et al., 2005; SOBEL, 2005; DALMOLIN et al., 2008; QUESNEL, 2008; NELSON e COUTO, 2010; TROXEL, 2014).

A gravidade máxima dos sinais em cães costuma aparecer dentro de 12- 24 horas e desaparecem na ordem inversa de seu aparecimento (QUESNEL, 2008; NELSON e COUTO, 2010). Como a toxina liga-se irreversivelmente às proteínas da JNM, a recuperação ocorre ao passo que novas proteínas de ligação são formadas. Desta forma, animais leve a moderadamente acometidos recuperam-se entre uma a três semanas, enquanto nos casos mais graves o prognóstico é desfavorável; podendo ocorrer óbito por parada respiratória ou infecções secundárias, principalmente pulmonares e urinária (SHELTON, 2002; OLBY, 2004; QUESNEL, 2008; SILVA et al., 2008; NELSON e COUTO, 2010).

Deve-se prevenir a doença impedindo o acesso dos animais a fontes potenciais de toxina botulínica, especialmente carcaças em decomposição. E oferecendo apenas alimentos completamente cozidos (lembrando que a refrigeração não inativa a toxina botulínica), especialmente carne proveniente de matadouros (QUESNEL, 2008; SILVA et al., 2008).

2.2.7.1 Tratamento suporte

Um tratamento de suporte meticuloso pode resultar em completa recuperação do paciente com botulismo (TROXEL, 2014). A letalidade causada pela doença diminui de forma considerável quando a assistência médica dos pacientes é prestada em unidades de terapia intensiva. Mortes precoces geralmente resultam de falha em reconhecer a gravidade da doença e retardo em iniciar a terapia (ASSUNÇÃO et al., 2005; BARSANTI, 2008).

A severidade dos sinais clínicos e o prognóstico dos casos de botulismo são dose dependente. Assim, o protocolo de tratamento com base na terapia suporte pode ser ineficiente para casos de intoxicação grave, pois tem como objetivo apenas combater os sinais clínicos, principalmente a dificuldade respiratória e impedir as complicações como infecções secundárias e disfagia (SHELTON, 2002; SILVA et al., 2008).

Ocorrerá recuperação espontânea dos animais moderadamente afetados apenas com tratamento suporte, se puderem ser evitadas as infecções secundárias (ANDRADE, 2005; DALMOLIN et al., 2008); sabendo que as neurotoxinas botulínicas clivam proteínas necessárias para exocitose de vesículas contendo acetilcolina, não lesionando o neurônio e nem a junção neuromuscular (BARSANTI, 2008).

Em pacientes com disfagia (diminuição do reflexo de deglutição) o monitoramento adequado do estado nutricional e de hidratação é importante, necessitando de assistência para a ingestão de água e comida (SHELTON, 2002; OLBY, 2004; NASCENTE et al., 2005; BARSANTI, 2008). Reposição de eletrólitos, além da alimentação por meio de sonda, deve ser mantida até que o paciente apresente recuperação da capacidade de deglutição (SHELTON, 2002; OLBY, 2004; ASSUNÇÃO et al., 2005; NASCENTE et al., 2005; BARSANTI, 2008; QUESNEL, 2008). Se houver o desenvolvimento de megaesôfago, o cão deve receber auxílio para alimentar-se com a cabeça levantada, e esta deve permanecer assim por aproximadamente 30 minutos após a alimentação (OLBY, 2004).

A disfagia, regurgitação nasal, comprometimento dos movimentos da língua, palato e, principalmente, da musculatura respiratória são sinais indicativos de gravidade e exigem atenção redobrada para evitar broncoaspiração e insuficiência

respiratória. Nesses casos, a ventilação pulmonar em terapia intensiva com capacidade máxima de monitoração é essencial para evitar o óbito (OLBY, 2004; ASSUNÇÃO et al., 2005; QUESNEL, 2008). Gasometria arterial deve ser realizada em animais com tetraplegia para verificar se há hipoventilação (OLBY, 2004).

Se a ingestão recente da toxina botulínica está sob suspeita, em caso de botulismo alimentar, o esvaziamento do estômago e lavagens gástricas são úteis e a administração de laxantes e enemas podem ajudar a remover a toxina que ainda não foi absorvida pelo trato gastrointestinal (SHELTON, 2002; ANDRADE, 2005; ASSUNÇÃO et al., 2005; NASCENTE et al., 2005; QUESNEL, 2008; NELSON e COUTO, 2010). A retenção fecal pode ocorrer, nestes casos enemas e laxativos também são indicados (ANDRADE, 2005; BARSANTI, 2008; QUESNEL, 2008; SILVA et al., 2008).

O paciente deve receber avaliações regulares, em casos de retenção urinária, deve-se realizar compressão manual para esvaziamento da bexiga ou cateterização (OLBY, 2004; BARSANTI, 2008; QUESNEL, 2008).

Mudar o paciente frequentemente de posição e acolchoamento evita úlceras de decúbito, enquanto este apresentar-se em decúbito. Fisioterapia minimizam a contração tendínea e a atrofia muscular, portanto movimentação do animal e massagem a cada 6 horas, enquanto o animal estiver em decúbito, são importantes (SHELTON, 2002; OLBY, 2004; QUESNEL, 2008).

Pomada oftálmica evita ulcerações de córnea no caso do desenvolvimento de ceratite ou ceratoconjuntivite seca (BARSANTI, 2008; QUESNEL, 2008).

Se não houver infecções secundárias, os antibióticos em geral não apresentam benefícios, pois não ocorre colonização gastrointestinal pelo *C. botulinum*. O uso de antibióticos sem necessidade pode ser nocivo caso ocorra distúrbios da microflora entérica, podendo favorecer a colonização e a lise do microrganismo *C. botulinum* levando a liberação adicional de neurotoxina (SHELTON, 2002; NASCENTE et al., 2005; BARSANTI, 2008; QUESNEL, 2008).

Aminoglicosídeos, penicilina procaína, tetraciclina, ampicilina, eritromicina, ciprofloxacina, fenotiazínicos, agentes antiarrítmicos e magnésio podem potencializar o bloqueio neuromuscular, sendo contra indicado no tratamento do botulismo em cães (OLBY, 2004; QUESNEL, 2008).

Em humanos, nos casos de botulismo por ferimento, recomenda-se o uso de penicilina cristalina na dose de 10 a 20 milhões de UI/dia para adultos, e 300 mil

UI/kg/dia para crianças, em doses fracionadas de 4 em 4 horas, via intravenosa, por 7 a 10 dias. O metronidazol, também pode ser utilizado na dose de 2g/dia para adultos, e 15mg/kg/dia para crianças, via intravenosa, de 6 em 6 horas. O debridamento cirúrgico deve ser realizado no ferimento, preferencialmente após o uso do soro antibotulínico (SAB), mesmo quando a ferida apresentar um bom aspecto. No botulismo intestinal em menores de 1 ano de idade, acredita-se que a lise de bactérias na luz intestinal provocada pelo antibiótico, pode piorar a evolução da doença por aumento dos níveis de toxina circulante; em adultos esse efeito não tem sido descrito. O SAB e a antibioticoterapia não estão indicados para crianças menores de um ano de idade nos casos de botulismo intestinal (ASSUNÇÃO et al., 2005).

2.2.7.2 Tratamento específico

O único tratamento específico para o botulismo é a administração de soro anti-botulínico (SAB). A antitoxina pode parar a progressão da paralisia e diminuir a duração da mesma, conseqüentemente diminuir o tempo de dependência de ventilação mecânica (SOBEL, 2005).

Antes da administração do SAB, todas as amostras clínicas para exames diagnósticos devem ser coletadas (ASSUNÇÃO et al., 2005). A antitoxina deve ser ministrada no início do curso da doença, de preferência antes das primeiras 24 horas após o início dos sintomas, pois a antitoxina neutraliza apenas as toxinas que ainda não estão ligadas às terminações nervosas (SHELTON, 2002; SOBEL, 2005; BARSANTI, 2008; QUESNEL, 2008; NELSON e COUTO, 2010; TROXEL, 2014).

Para humanos o soro tem apresentação bi ou trivalente (contra os tipos A e B ou A, B e E de toxina botulínica). A dose é uma ampola de SAB bi ou trivalente por via intravenosa, diluída em solução fisiológica a 0,9%, na proporção de 1:10, para infundir em aproximadamente 1 hora (ASSUNÇÃO et al., 2005).

A antitoxina humana trivalente (tipos A, B e E) não é eficaz no tratamento de botulismo em cães (BARSANTI, 2008; TROXEL, 2014); já a antitoxina tipo C (10.000 a 15.000UI IV ou IM por animal, repetir a dose com intervalo de 4 horas) (SHELTON, 2002; QUESNEL, 2008; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010; NELSON e COUTO;

2010), ou polivalente com essa antitoxina em sua composição (5ml IV ou IM), é eficaz na neutralização de toxinas que apresentam-se circulante (SHELTON, 2002; QUESNEL, 2008; NELSON e COUTO; 2010).

O uso da antitoxina está relacionado a efeitos adversos, incluindo anafilaxia e outras reações de hipersensibilidade (SOBEL, 2005). Portanto, é aconselhada a aplicação prévia intradérmica de 0,1ml de soro para avaliar eventual reação de hipersensibilidade, esta não ocorrendo em 20 minutos, pode-se administrar a dose completa (SHELTON, 2002; QUESNEL, 2008; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010).

O SAB tipo C é ineficaz após a penetração da toxina nas terminações nervosas, mas pode evitar conjugações extras se a absorção ainda estiver ocorrendo (SHELTON, 2002; QUESNEL, 2008; NELSON e COUTO; 2010).

Vacinas com toxóides botulínicos são utilizadas em outras espécies como forma de prevenção na medicina veterinária, principalmente em ruminantes e aves silvestres. Entretanto, no caso dos cães, a vacinação dificilmente seria justificável, uma vez que casos de botulismo nesta espécie são raros (SILVA et al., 2008).

2.2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. S. P. Botulismo: Revisão de literatura. **[monografia]** lato sensu em medicina veterinária. Brasília. 2005, 92f.

ASSUNÇÃO, L.; PAMPLONA, M.; GENTIL, K.; MIRANDA, D. Manual integrado de vigilância epidemiológica do botulismo. **Ministério da Saúde: Secretária de Vigilância em Saúde**. Brasília: editora do ministério da saúde. 2005, p. 1-88.

BAILEY, J. G. Fisiologia muscular. In: REECE, W. O. **Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006, cap. 49, p. 819-821.

BALDASSI, L.; HIPOLITO, M.; PORTUGAL, M. A. S. C.; CALIL, E. M. B.; MOULIN, A. A. P.; PIRES, D. C. Botulismo bovino: comprovação laboratorial do diagnóstico clínico, período 1986-1989. **Revista Saúde Pública**. São Paulo. 1991, p. 371-374.

BARSANTI, J. A. Botulism. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3 ed. Canada: Elsevier. 2006, cap. 42, p. 389 – 395.

BARSANTI, J. A.; WALSER, M.; HATHEWAY, C. L.; BOWEN, J. M.; CROWELL, W. Type C botulism in American Foxhounds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 1978, v. 172, p. 809-813.

BEHAN, M. Organização do sistema nervoso. In: REECE, W. O. **Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006, cap. 42, p. 705-706.

BRAUND, K.G. Neurotoxic Disorders. **Clinical Neurology in Small Animals - Localization, Diagnosis and Treatment**. New York, USA. 2003, p. 1-23.

BRIN, M. F. Botulinum Toxin: Chemistry, Pharmacology, Toxicity, and Immunology. **The pharmacology of botulinum toxin**. New York, USA: [s.n], 1997, suplement 6, p.146-168.

BÖHNEL, H.; GESSLER, F. Botulinum toxins -- cause of botulism and systemic diseases? **Veterinary Research Communications**. 2005, v. 29, p.313-345.

CERESER, N. D.; COSTA, F. M. R.; ROSSI, O. D. J.; DA SILVA, D. A. R.; SPEROTTO, V. R. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**. Santa Maria, RS. 2008, v.38, n.1, p.280-287.

COSTA, M. ; BARIANI, M. H.; SANTOS, P. C. G. Botulismo canino: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica Medicina Veterinária**. São Paulo, SP. 2006, n. 7.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. A sinapse. In: CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008, cap.5, p. 75-79.

CUNNINGHAN, J. G.; KLEIN, B. G. Introdução ao sistema nervoso. In: CUNNINGHAN, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008, cap.3, p. 61-64.

CUNNINGHAN, J. G.; KLEIN, B. G. O conceito de neurônios motores inferior e superior e sua disfunção. In: CUNNINGHAN, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008, cap.9, p. 101-104.

CUNNINGHAN, J. G.; KLEIN, B. G. O neurônio. In: CUNNINGHAN, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008, cap.4, p. 67-72.

DALMOLIN, F.; MELLO, F. P. S.; PINTO FILHO, S. T. L.; GAIRA, M. S. Botulismo em cão – Relato de três casos no município de Uruguaiana – RS. **35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. 2008, p. 191-192.

DEWEY, C.W.; Junctionsopathies; Disorders of the neuromuscular junctions. In: e botulismo seriam as principais causas de tetraparesia flácida aguda e repentina DEWEY,C. W.; A practical guide to canine and feline neurology. Iowa: 2008, 2 ed, cap 16, p517-558.

DARKE, P. G.; ROBERTS, T. A.; SMART, J. L.; BRADSHAW, P. R. Suspected botulism in foxhounds. **Veterinary Record**. 1976, v. 99, p. 98-99.

DOUTRE, M. P. Second case of type D botulism in a dog in Senegal. **Revue delevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux**. 1983, v. 36, p. 131-132.

DOUTRE, M. P. Type D animal botulism in Senegal. First observation in a dog. **Revue delevage et de medecine veterinaire des pays tropicaux**. 1982, v. 35, p. 11-14.

DUTRA, I. S.; DOBEREINER, J.; SOUZA, A. M. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. [S.l: s.n], 2005, p. 115-119.

ELAD, D., et al. Natural Clostridium botulinum Type C toxicosis in a group of cats. **Journal of Clinical Microbiology**. [S.l]: copyright. 2004, v. 42, n.11, p. 5406-5408.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4 ed. São Paulo: Manole. 1997, v.1 p. 540.

FERNÁNDEZ, V. L.; BERNARDINI, M. Enfermidades Inflamatórias. **Neurologia em cães e gatos**. 1ed. São Paulo, SP: MedVet. 2010, cap8, 180-181.

FUJINAGA, Y. Interaction of botulinum toxin with the epithelial barrier. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Japan: copyright. 2009, v.2010, article ID 974943.

FUJINAGA Y. Transport of bacterial toxins into target cells: pathways followed by cholera toxin and botulinum progenitor toxin. **Journal Biochemistry**. 2006, v. 140, p. 155-160.

GALEY, F. D.; TERRA, R.; WALKER, R.; ADASKA, J.; ETCHEBARNE, M. A.; PUSCHNER, B.; FISHER, E.; WHITLOCK, R. H.; ROCKE, T.; WILLOUGHBY, D.; TOR, E. Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. . **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 2000, v. 12, p. 204–209.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Excitação do músculo esquelético: transmissão neuromuscular e acoplamento excitação-contração. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2006, cap. 7, p.85-90.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Organização do sistema nervoso central, funções básicas das sinapses e “substâncias neurotransmissoras”. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2006, cap. 45, p.555-557, 559-563.

HENKEL, J. S.; JACOBSON, M.; TEPP, W.; PIER, C.; JOHNSON, E. A.; BARBIERI, J. T. Catalytic properties of botulinum neurotoxins subtypes A3 and A4. **Journal Biochemistry**. 2009, v. 48, p. 2522–2528.

HIRAI Y. [Clostridium botulinum and botulinum neurotoxin]. **Brain Nerve**. 2011, v. 63, p. 755-761

JIN, Y.; et al. Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins – differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C. **Microbiology**. [S.l: s.n], 2009, p. 35-45.

KLEIN, B. O. Transmissão sináptica e o ciclo biológico. In: REECE, W. O. **Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006, cap. 44, p. 732-739, 750-760.

LINDSTROM, M.; KORKEALA, H. Laboratory diagnostics of botulism. **Clinical microbiology reviews**. Finland: copyright, 2006. V. 19, n. 2, p. 298-314.

LINDSTROM, M.; KETO, R.; MARKKULA, A.; NEVAS, M.; HIELM, S. KORKEALA, H. Multiplex PCR Assay for Detection and Identification of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F in Food and Fecal Material. **Applied and Environmental Microbiology**. 2001, v. 67, p. 5694–5699.

MEDICI, D.D. et al. Multiplex PCR for detection of botulinum neurotoxin- Producing clostridia in clinical, food, and environmental samples. **American Society for Microbiology**. [S.l.]: copyright. 2009, v. 75, n.20, p. 6457-6461.

MENDES, R. Botulismo no mel: Revisão de literatura. **[monografia] lato sensu** em medicina veterinária. Brasília: instituto de pós graduação qualittas, 2008. 110f.

MEYER, K. F.; EDDIE, B. Botulism in the United States, 1899-1996. **Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers**. Atlanta. 1998, p. 1-43.

MONEGO, F.; MABONI, F.; VARGAS, A. C.; ASSIS, R. A. Diagnóstico de *Clostridium botulinum* tipo C em cão – relato de caso. **Veterinária Notícias**. Uberlândia – MG. 2006, v.12, n.2, p. 79 – 81.

NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; FARIA, R. O.; SCHUCH, L. F. D.; MEIRELES, M. C. A.; GASPAR, L. F. Botulismo em cão – relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**. n. 55. São Paulo: Guará. 2005, p. 48 – 50.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Doenças dos nervos periféricos e da junção neuromuscular. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010, cap.71, p. 1094, 1104-1106.

OLBY, N. J. Tetraparesis. In: PLATT, S. R.; OLBY, N. J. **BSAVA Manual of Canine and feline neurology**. 3 ed. England: Copyright. 2004, cap. 14, p. 214-217, 234.

PANCIERA, R.J.; RITCHEY, J.W.; BAKER, J. E.; DIGREGORIO, M. Trigeminal and polyradiculoneuritis in a dog presenting with masticatory muscle atrophy and horner's syndrome . **Veterinary Pathology Online**. [S.l.]: sage. 2002, v. 39, p. 146-149.

QUESNEL, A. D. Botulismo. In: TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Consulta Veterinária em 5 minutos: Espécies canina e felina**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2008. p. 172-173.

SALVARANI, R. S.; ALVES, M. L.; SUZUKI, E. Y.; ZAPPA, V. Botulismo em cães – relato de caso. **Revista Científica Eletrônica Medicina Veterinária**. Garça – SP. n.10, 2008.

SHELTON, G. D. Myasthenia gravis and disorders of neuromuscular transmission. In: SHELTON, G. D. **The Veterinary Clinics of North America: Small animal practice**. 1 ed. Philadelphia: Copyright. 2002, v. 32, p.189-191, 201-204.

SILVA, R. O. S.; SALVARANI, F. M.; PIRES, P. S.; ASSIS, R. A.; SALLES, P. R.; CARVALHO, M. B.; LOBATO, F. C. F. Caso de botulismo tipo C em cão. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. Recife. 2008, v. 11, n. 2/3, p. 86-89.

SOBEL, J. Botulism. **Foodborne and Diarrheal Branch, Centers for Disease Control and Prevention**. Atlanta: Copyright. 2005, p. 1167- 1173.

SWERZEK, T. W. Toxic infectious botulism in foals and adult horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. [S.l: s.n.]. 1980, v. 176, p. 217–220.

TAYLOR, S. M. Localização da lesão e o exame neurológico. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010, cap.63, p. 989-990, 993.

TROXEL, M. Diffuse lower motor neuron dysfunction in dogs. **Clinician's brief**. Woburn, Massachusetts. [s.n.]. January, 2014. P. 75-79.

URIARTE, A.; THIBAUD, J.L.; BLOT, S. Botulism in 2 urban dogs. **Canadian Veterinary Journal**. [S.l.]: Copyright. 2010, v.51, p. 1139-1142.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar estudo clínico-epidemiológico do botulismo, no contexto das afecções que desencadeiam tetraparesia flácida e/ou fraqueza neuromuscular, em cães de uma população hospitalar (Hospital Escola Veterinário - HOVET, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá – UNC).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar aspectos clínicos e neurológicos de cães com sintomatologia neuromuscular;
- Avaliar a epidemiologia clínica do botulismo canino no município de Cuiabá e outras localidades do MT;
- Realizar o diagnóstico diferencial de afecções neuromusculares;
- Avaliar a contribuição das infecções por protozoários na determinação de enfermidade neuromuscular em cães;
- Avaliar a contribuição dos distúrbios metabólicos, eletrolíticos e das síndromes paraneoplásicas na determinação de sintomatologia neuromuscular em cães.

4 Capítulo II – ARTIGO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO CLÍNICA- EPIDEMIOLÓGICA DE BOTULISMO EM CÃES DE UMA POPULAÇÃO HOSPITALAR DO CENTRO OESTE DO BRASIL

4.1 INTRODUÇÃO

O botulismo é uma doença neuromuscular grave, não contagiosa, resultante da ação de uma potente toxina produzida pela bactéria anaeróbica *Clostridium botulinum* (ASSUNÇÃO et al., 2005). Apresenta-se sob três formas: botulismo alimentar, botulismo por ferimentos e botulismo intestinal (MEYER e EDDIE, 1998; SOBEL, 2005; LINDSTRON e KORKEALA, 2006). Os casos em caninos têm sido atribuídos à ingestão de carnes cruas ou putrefatas contendo a toxina pré-formada (NASCENTE et al., 2005). A ingestão da toxina botulínica com consequente absorção pelo trato gastrointestinal, permite a distribuição da neurotoxina na corrente sanguínea até chegar a junção neuromuscular impedindo a liberação do neurotransmissor acetilcolina pelo neurônio pré-sináptico (GALEY et al., 2000; NASCENTE et al., 2005; JIN et al., 2009). Dependendo da gravidade da intoxicação, os cães apresentam diferentes quadros clínicos, apresentando desde instabilidade ao moverem-se e fraqueza muscular, até prostração profunda e tetraparesia/plegia flácida generalizada; quando a paralisia atinge a musculatura diafragmática e os músculos intercostais, o animal apresenta dispnéia grave podendo chegar a óbito (MONEGO et al., 2006; MENDES, 2008; SILVA et al., 2008; NELSON e COUTO, 2010).

Embora diversas sejam as possibilidades, na rotina prática da neurologia, os pacientes com tetraparesia flácida geralmente possuem distúrbio: I) na transmissão neuromuscular por doença generalizada das radículas e/ou raízes nervosas (polirradiculite/polirradiculoneurite), especialmente das fibras motoras; II) dos nervos periféricos (polineuropatia); e/ou III) afecções da junção neuromuscular (JNM). Polimiopatias, especialmente miopatias inflamatórias e aquelas relacionadas à raça

também podem causar distúrbios da transmissão neuromuscular com apresentação de tetraparesia/plegia flácida (PATT e OLBY, 2004; PENDERIS, 2008; DEWEY, 2008).

O diagnóstico definitivo das afecções que causam tetraparesia/plegia flácida é importante não apenas para a instituição da terapia, mas para a elaboração e estabelecimento dos diagnósticos diferenciais (PATT e OLBY, 2004; SOBEL, 2005; LINDSTROM e KORKEALA, 2006; PENDERIS, 2008; DEWEY, 2008).

O teste padrão para a detecção de neurotoxinas botulínicas é a prova biológica com inoculação em camundongos (LINDSTROM e KORKEALA, 2006). O tratamento para botulismo tanto para humanos quanto para os animais consiste em um tratamento suporte, e um tratamento específico que consiste na administração da antitoxina botulínica que neutraliza apenas as toxinas que ainda não estão ligadas às terminações nervosas (SHELTON, 2002; OLBY, 2004; NASCENTE et al., 2005; SOBEL, 2005; DALMOLIN et al., 2008; QUESNEL, 2008; SILVA et al., 2008; NELSON e COUTO, 2010). Mortes envolvendo botulismo geralmente resultam de falha em reconhecer a gravidade da doença e retardo em iniciar a terapia, seja esta suporte ou específica.

O estudo clínico-epidemiológico e neurológico do botulismo em cães é extremamente importante no contexto das afecções que causam desordens da transmissão/junção neuromuscular nos animais de companhia, uma vez que diferentes enfermidades podem ser apresentadas com sintomatologia semelhante e a diferenciação pelos sinais clínicos torna-se extremamente difícil. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo clínico-epidemiológico e neurológico do botulismo canino em uma população hospitalar compreendida por cães admitidos no Hospital Escola Veterinário (HOVET) da Universidade de Cuiabá (UNIC) com sintomatologia neuromuscular.

4.2 METODOLOGIA

Todos os pacientes atendidos de junho de 2010 a março de 2014 pelo serviço técnico especializado em Neurologia Veterinária do HOVET da UNIC (Cuiabá, Mato Grosso) com sintomatologia variando de fraqueza muscular à tetraparesia/plegia

flácidas foram conduzidos adotando-se um sistema padrão para abordagem clínica e diagnóstica de pacientes com manifestações neuromusculares (STUCCHI et al. 2013).

Os procedimentos padrões visaram diagnosticar as diferentes afecções que levam ao curso clínico caracterizado por disfunção da transmissão/junção neuromuscular como: botulismo, *Miastenia gravis*, polirradiculoneurite idiopática, polirradiculite por protozoários, polimiosite, polineuropatia idiopática, polineuropatia por hipotireoidismo, distúrbios eletrolíticos e síndromes paraneoplásicas.

Durante abordagem clínica os animais foram submetidos ao exame clínico e neurológico completo repetidos frequentemente durante todo o período de observação. Um painel de diferentes exames foram realizados [hemograma, bioquímica clínica (ALT, FA, GGT, URE, CREAT, CPK, colesterol, triglicerídeos, albumina, globulina), perfil eletrolítico (Ca, P, Mg, Cl, K, Na), urinálise, varredura abdominal ultrassonográfica, varredura torácica radiográfica, esofagograma, sorologia para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum*, sorologia para detecção de anticorpos anti-receptores nicotínicos de acetilcolina, bioensaio de letalidade em camungongos para diagnóstico de botulismo].

Os testes bioquímicos gerais, hemograma, perfil eletrolítico, urinálise, varredura abdominal ultrassonográfica, varredura torácica radiográfica e esofagograma foram realizados no HOVET/UNIC para diagnóstico diferencial de distúrbios metabólicos, eletrolíticos e de síndromes paraneoplásicas que levam a apresentação neuromuscular.

A presença de anticorpos anti-*T. gondii* (anti-IgG canino) e anti-*N. caninum* (anti-IgG canino) foi verificada utilizando-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (CAMARGO 1964; CONRAD et al., 1993). A realização da técnica compreendeu uma série de reações acompanhadas de um soro controle positivo, um soro controle negativo e um controle de conjugado. Os resultados foram expressos pelas taxas de títulos de anticorpos de maior diluição do soro em que ainda se observe fluorescência específica. Os antígenos utilizados na RIFI para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* foram taquizoítos cultivados

em camundongos suíços e fixados em laminas de vidro. foram consideradas positivas as amostras de título maior ou igual a 1:64 e 1:50, respectivamente.

Para diagnóstico de *Miastenia gravis* foi realizado o exame sorológico para dosagem quantitativa de auto-anticorpos séricos contra RAchN (anticorpo anti-receptor de acetilcolina). O teste foi realizado no Comparative Neuromuscular Laboratory, University of California, San Diego, Estados Unidos.

Para o diagnóstico de botulismo foi utilizado o bioensaio de letalidade em camundongo, que é o teste padrão para detecção de toxina botulínica (ASSUNÇÃO et al., 2005; NASCENTE et al., 2005; SOBEL, 2005; GALEY et al., 2006; QUESNEL, 2008). Esse teste foi baseado em uma injeção intraperitoneal de um ml de soro dos pacientes com sintomatologia clínica já apresentada em ratos de laboratório (camundongos). O teste foi considerado positivo quando, dentre 72 horas de observação, os camundongos apresentarem sinais típicos do botulismo, tais como fraqueza muscular, pêlos arrepiados e angústia respiratória, sinais estes que manifestam-se nos camundongos por um acinturamento típico chamado como cintura de vespa (ocorre estreitamento da cintura) (SHELTON, 2002; LINDSTROM e KORKEALA, 2006).

4.3 RESULTADOS

De junho de 2010 a março de 2014 o HOVET/UNIC atendeu 44 casos de tetraparesia flácida de origem neuromuscular; sendo que 22 foram diagnosticados como botulismo (tabela 01 - anexos). Dentre as afecções neuromusculares o botulismo representou 50% dos atendimentos.

Dos 22 casos diagnosticados, 18 apresentavam botulismo desenvolvido devido à provável ingestão da neurotoxina botulínica através de carcaça de animais, restos de lixo em decomposição ou alimento caseiro deteriorado; 2 apresentavam botulismo devido presença de feto em decomposição no útero; e 1 apresentou botulismo intestinal.

Durante o período de junho de 2010 a março de 2014, no HOVET/UNIC foram realizados 8.626 novos atendimentos. Sendo 44 casos diagnosticados como doença

neuromuscular (0,51%), dos 44 casos com doença neuromuscular, 22 tiveram o diagnóstico de botulismo (0,26%). O botulismo representou 50% das doenças neuromusculares atendidas neste período. Dentre os animais livres de botulismo o diagnóstico foi de polirradiculoneurite, polineuropatia progressiva idiopática, síndrome paraneoplásica, miastenia congênita e distúrbio eletrolítico envolvendo o eletrólito cálcio e/ou potássio. Nenhum animal apresentou sorologia positiva para *T. gondii*, *N. caninum* e *miastenia gravis*.

Dentre os cães acometidos não houve correlação da doença com espécie, sexo ou idade. Os sinais neurológicos observados variaram de fraqueza muscular que piorava com exercício a tetraplegia flácida. O principal reflexo acometido foi o patelar que se manifestou ausente em cinco cães no momento da apresentação clínica e diminuído em um cão. Déficits de nervos cranianos (VII nervo craniano) foram observados em quatro dos cães acometidos pelo botulínica. O reflexo de retirada estava comprometido em todos animais, apresentando-se ausente em apenas um cão, e foi o primeiro reflexo a normalizar, sendo o retorno do reflexo patelar tardio quando comparado ao reflexo de retirada. A recuperação da condição neuromuscular variou de 6 a 14 dias. Foi possível observar em todos os pacientes diminuição ou ausência de reações posturais (propriocepção e/ou saltitar), sendo os membros posteriores mais gravemente acometidos que os anteriores. Ocorreu disфонia em dois cães e todos os pacientes apresentavam movimentação do rabo.

4.4 DISCUSSÃO

Através da anamnese dos pacientes e um minucioso exame físico e neurológico é possível chegar ao diagnóstico presuntivo de doença neuromuscular (ASSUNÇÃO et al., 2005; TROXEL, 2014). Deve-se listar como diagnóstico diferencial as doenças que causam disfunções na condução elétrica até a JNM, tais como: polirradiculoneurite, *Miastenia gravis*, paralisia causada por picada de carrapato, botulismo, intoxicação crônica por organofosforados, drogas que causam bloqueio neuromuscular (aminoglicosídeos, fenotiazínicos, antiarrítmicos, magnésio e metoflurano) (SHELTON, 2002; BARSANTI, 2008; TROXEL, 2014), intoxicação por picada de cobra coral e envenenamento com lasalocida (ionóforo usado contra

coccidiose em frangos e como promotor de crescimento para ruminantes) (URIARTE et al., 2010).

A importância desse trabalho destaca-se por dois grandes motivos: I) é o primeiro estudo clínico e epidemiológico com maior número de casos já documentados; II) sua metodologia permitiu o diagnóstico diferencial para outras afecções que podem gerar a mesma sintomatologia do botulismo.

Os exames complementares realizados auxiliaram no caminho para o diagnóstico definitivo; o estabelecimento do uso da prova biológica em camundongos foi fundamental para o diagnóstico definitivo de botulismo. A avaliação dos resultados dos exames dos cães desse estudo permitiu verificar que os resultados de exames complementares devem ser analisados com cautela e no contexto clínico do paciente; por exemplo, o aumento dos níveis séricos de CPK nem sempre poder ser usado isolado para diagnóstico de polimiotopia, uma vez que o decúbito excessivo induzido pela fraqueza muscular, independente da etiologia, pode resultar em aumento dessa enzima muscular. Alterações não específicas em exames de perfil eletrolítico e hemograma também ocorreram.

Nesse estudo a prevalência de botulismo encontrada foi 50%, número esse que pode ser considerado expressivamente grande frente a uma série de outros diagnósticos diferenciais para os quadros clínicos apresentados pelos animais. Dentre todos os diagnósticos diferenciais, a polirradiculoneurite aguda e botulismo seriam as principais causas de tetraparesia flácida aguda e repentina (DEWEY; 2008). Não há estudos nacionais sobre a prevalência dessas doenças em animais com tal manifestação neurológica. Estudos internacionais podem ser encontrados, mas em todos a polirradiculoneurite aguda prevalece, e o botulismo nem chega a ser diagnosticado dentre as afecções diferenciais (DEWEY; 2008). Essa diferença pode ser explicada, em grande parte, pela localização geográfica do estudo. A totalidade de casos de botulismo descrito em cães na literatura estão restritos a casos isolados, dessa forma há uma lacuna sobre dados epidemiológicos, clínicos e neurológicos para melhor compreensão da enfermidade de ocorrência natural em canídeos.

O período de incubação da neurotoxina progenitora após a ingestão de alimentos contaminados pode variar de horas até 6 dias (BARSANTI, 2006; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010), portanto os sinais clínicos podem surgir de

24 a 48h (NASCENTE et al., 2005), até 6 dias após a ingestão da toxina (BARSANTI, 2006; NASCENTE et al., 2005; QUESNEL, 2008). Dos casos estudados apenas dois proprietários souberam informar sobre acesso dos animais a alimento em decomposição, apresentando intervalo de 2 a 4 dias entre a ingestão da neurotoxina e o início dos sinais clínicos.

Dependendo da gravidade da intoxicação, os sinais de botulismo pode variar desde instabilidade ao movimento e fraqueza, até prostração profunda e paralisia flácida generalizada ou mesmo tetraplegia (BARSANTI, 2006; SILVA et al., 2008; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010). A apresentação caracterizada por tetraparesia, perda generalizada do tônus muscular, hiporreflexia, envolvimento da musculatura facial, laringeal, déficits de nervos cranianos e disфонia tem sido relatada comumente com o botulismo (OLBY, 2004; NASCENTE et al., 2005; COSTA et al., 2006; QUESNEL, 2008; BARSANTI, 2008; NELSON e COUTO, 2010; TROXEL, 2014). A severidade do sinais clínicos pode variar de acordo com a quantidade de toxina ingerida e a susceptibilidade do animal (ANDRADE, 2005; MONEGO et al., 2006; BARSANTI, 2008; NELSON e COUTO, 2010; TROXEL, 2014). Apenas um dos animais com botulismo apresentou instabilidade ao movimentar e fraqueza que piorava com exercício, enquanto 15 animais apresentaram tetraparesia flácida generalizada e dois tetraplegia.

Ao exame neurológico é comum reflexos espinhais apresentarem-se diminuídos ou ausentes (BARSANTI, 2006; COSTA et al., 2006; SALVARANI et al., 2008; FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010; NELSON e COUTO, 2010; TROXEL, 2014). Treze cães apresentaram reflexo de retirada diminuído e apenas dois apresentaram ausente, dois dos cães mantiveram reflexos de retirada normais. Oito cães apresentaram reflexo patelar diminuído e 9 cães reflexo patelar ausente. Dados neurológicos de tres pacientes foram perdidos durante o estudo e a avaliação do dos relflexo de retirada e patelar não foi realizada no momento da redação desse trabalho. Movimentação da cauda costuma estar preservada, apesar da tetraparesia grave (BARSANTI, 2006; NELSON e COUTO, 2010), e foi observado em 16 cães.

É comum o acometimento de nervos cranianos (OLBY, 2004; SOBEL, 2005; NASCENTE et al., 2005; BARSANTI, 2006; NELSON e COUTO, 2010; TROXEL, 2014), e 11 cães apresentaram déficits de nervos cranianos enquanto 5 cães apresentaram ausência de déficits. Quando ocorre o acometimento do nervo

laríngeo pode ocorrer uma alteração ou perda de voz (OLBY, 2004), sendo que 11 pacientes apresentaram disfonia enquanto 6 dos cães apresentaram-se normal.

Desenvolvimento de megaesôfago pode ocorrer em pacientes com botulismo (OLBY, 2004; COSTA et al., 2006; DALMOLIN et al., 2008; SALVARANI et al., 2008; NELSON e COUTO, 2010); 4 pacientes desenvolveram megaesôfago confirmado através da realização de esofagograma.

A duração da enfermidade nos cães que se recuperam tem variado de uma a três semanas (ETTINGER e FEELDMAN, 1997; ANDRADE, 2005; DALMOLIN et al., 2008), apresentando-se em média 14 dias (FERNANDEZ e BERNARDINI, 2010). Cinco cães recuperaram-se em uma semana, oito cães levaram duas semanas e dois cães cerca de três semanas.

Um tratamento suporte metuculoso pode resultar em completa recuperação do paciente com botulismo (ASSUNÇÃO et al., 2005; TROXEL, 2014). Ocorre recuperação espontânea dos animais moderadamente afetados apenas com tratamento suporte; durante o tratamento deve-se tomar medidas para evitar as infecções secundárias (ANDRADE, 2005; DALMOLIN et al., 2008; NELSON e COUTO, 2010). O tratamento suporte instituído nesse estudo consistiu em monitoramento constante da respiração, troca de decúbito constante, acolchoamento do paciente para que não ocorressem úlceras, alimentação e hidratação adequada junto com uma fisioterapia diária. Essas medidas permitiram a recuperação a medida que a toxina é metabolizada e os cuidados durante a recuperação clínica dos paciente permite o recebimento da alta hospitalar no menor tempo possível, uma vez que minimiza as complicações secundárias que aumentam o tempo de internação.

Os casos naturais de botulismo em cães têm sido atribuídos à ingestão de carne deteriorada ou carne crua (GALEY et al., 2000; SHELTON, 2002). Os casos naturais de botulismo em cães têm sido atribuídos à ingestão de carne deteriorada ou carne crua (GALEY et al., 2000; SHELTON, 2002). Dos 20 casos de botulismo diagnosticados, 17 apresentavam botulismo alimentar (devido à provável ingestão da neurotoxina botulínica através de carcaça em decomposição, restos de lixo em decomposição ou alimento caseiro deteriorado).

Quatro (04) outros animais não tiveram a via oral como porta de entrada da toxina; dois tiveram como fonte da toxina fetos mortos putrefeitos retidos no útero, um teve como diagnóstico presuntivo o quadro de botulismo intestinal, e outro teve

como fonte da toxina uma grande ferida cutânea com tecido necrótico. Na medicina veterinária o botulismo intestinal é conhecido nas aves, e a ocorrência é desconhecida nas demais espécies animais (GALEY et al., 2000). Botulismo devido a presença de feto em decomposição no útero não foi encontrado em nenhum outro trabalho ou relato na literatura. O papel de ferimentos profundos e necrose tecidual já foi bem estabelecido nos casos de tétano, porém nunca antes relatados em casos naturais de botulismo em cães.

Apesar de todo o conhecimento técnico-científico da atualidade, até a década passada acreditava-se que cães e gatos não eram sensíveis à toxina botulínica. Durante o período do estudo não foi atendido nenhum gato portador de afecção neuromuscular, por isso não foi possível estudar a enfermidade nessa espécie. Os resultados desse trabalho sugerem que botulismo representa a principal causa de manifestação neuromuscular em cães na região centroeste brasileiro, conseqüentemente deve estar sempre presente como o principal diagnóstico diferencial em animais que apresentarem manifestação neuromuscular.

Os resultados desse trabalho são inéditos, não só pelas considerações epidemiológicas e clínicas já ressaltadas anteriormente, mas também por ser a primeira vez que se apresentam três outras formas de aquisição da toxina botulínica.

4.5 CONCLUSÃO

Durante o período foram admitidos 44 pacientes com desordem neuromuscular e o botulismo foi diagnosticado em 22 animais com tetraparesia flácida de origem neuromuscular. Dezoito (18) cães desenvolveram botulismo devido à provável ingestão da neurotoxina botulínica através de carcaça de animais, restos de lixo em decomposição, ou alimento caseiro deteriorado; em 02 animais o botulismo ocorreu devido a presença de fetos em decomposição no útero, 01 animal apresentou botulismo intestinal e 01 apresentou botulismo por ferimentos. Não houve correlação da doença com o sexo ou idade dos animais.

4.6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ASSUNÇÃO, L.; PAMPLONA, M.; GENTIL, K.; MIRANDA, D. Manual integrado de vigilância epidemiológica do botulismo. **Ministério da Saúde: Secretária de Vigilância em Saúde**. Brasília: editora do ministério da saúde. 2005, p. 1-88.

DALMOLIN, F.; MELLO, F. P. S.; PINTO FILHO, S. T. L.; GAIRA, M. S. Botulismo em cão – Relato de três casos no município de Uruguaiana – RS. **35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. 2008, p. 191-192.

DEWEY, C.W.; Junctionsopathies; Disorders of the neuromuscular junctions. In: e botulismo seriam as principais causas de tetraparesia flácida aguda e repentina DEWEY, C. W.; A practical guide to canine and feline neurology. Iowa: 2008, 2 ed, cap 16, p517-558.

DUTRA, I. S.; DOBEREINER, J.; SOUZA, A. M. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. [S.l: s.n], 2005, p. 115-119.

GALEY, F. D.; TERRA, R.; WALKER, R.; ADASKA, J.; ETCHEBARNE, M. A.; PUSCHNER, B.; FISHER, E.; WHITLOCK, R. H.; ROCKE, T.; WILLOUGHBY, D.; TOR, E. Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. . **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 2000, v. 12, p. 204–209.

JIN, Y.; et al. Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins – differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C. **Microbiology**. [S.l: s.n], 2009, p. 35-45.

LINDSTROM, M.; KORKEALA, H. Laboratory diagnostics of botulism. **Clinical microbiology reviews**. Finland: copyright, 2006. V. 19, n. 2, p. 298-314.

MENDES, R. Botulismo no mel: Revisão de literatura. **[monografia] lato sensu** em medicina veterinária. Brasília: instituto de pós graduação qualittas, 2008. 110f.

MEYER, K. F.; EDDIE, B. Botulism in the United States, 1899-1996. **Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers**. Atlanta. 1998, p. 1-43.

MONEGO, F.; MABONI, F.; VARGAS, A. C.; ASSIS, R. A. Diagnóstico de *Clostridium botulinum* tipo C em cão – relato de caso. **Veterinária Notícias**. Uberlândia – MG. 2006, v.12, n.2, p. 79 – 81.

NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; FARIA, R. O.; SCHUCH, L. F. D.; MEIRELES, M. C. A.; GASPAS, L. F. Botulismo em cão – relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**. n. 55. São Paulo: Guará. 2005, p. 48 – 50.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Doenças dos nervos periféricos e da junção neuromuscular. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010, cap.71, p. 1094, 1104-1106

OLBY, N. J. Tetraparesis. In: PLATT, S. R.; OLBY, N. J. **BSAVA Manual of Canine and feline neurology**. 3 ed. England: Copyright. 2004, cap. 14, p. 214-217, 234.

QUESNEL, A. D. Botulismo. In: TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Consulta Veterinária em 5 minutos: Espécies canina e felina**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2008. p. 172-173.

SHELTON, G. D. Myasthenia gravis and disorders of neuromuscular transmission. In: SHELTON, G. D. **The Veterinary Clinics of North America: Small animal practice**. 1 ed. Philadelphia: Copyright. 2002, v. 32, p.189-191, 201-204.

SILVA, R. O. S.; SALVARANI, F. M.; PIRES, P. S.; ASSIS, R. A.; SALLES, P. R.; CARVALHO, M. B.; LOBATO, F. C. F. Caso de botulismo tipo C em cão. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. Recife. 2008, v. 11, n. 2/3, p. 86-89.

SOBEL, J. Botulism. **Foodborne and Diarrheal Branch, Centers for Disease Control and Prevention.** Atlanta: Copyright. 2005, p. 1167- 1173.

5 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

- Os resultados desse trabalho sugerem que botulismo representa a principal causa de manifestação neuromuscular em cães na região centro-oeste brasileiro, conseqüentemente deve estar sempre presente como o principal diagnóstico diferencial em animais que apresentarem manifestação neuromuscular;
- Embora o botulismo seja uma importante causa de afecção neuromuscular aguda, o estudo permitiu o diagnóstico diferencial de outras enfermidades que tem curso clínico similar, principalmente a polirradiculoneurite;
- Distúrbios metabólicos, eletrolíticos, polineuropatia idiopática e síndromes paraneoplásicas também foram diagnosticadas e contribuíram, em menor escala, na determinação de sintomatologia neuromuscular em cães;
- A contribuição das infecções por protozoários na determinação de enfermidade neuromuscular em cães não foi significativa, embora muito relatada na literatura.

6 ANEXOS

Tabela 01 - Pacientes com tetraparesia flácida diagnosticados como botulismo e não botulismo.

BOTULISMO	OUTRAS AFECÇÕES
20985 Tigresa	21223 Dande
25871 Scoob	22060 Argos
18 200 Mel	21945 Torque
20 557 Lion	22260 Shirra
21616 Pretinha	19662 Tequila
22195 Dolly	25464 Laila
24795 Pixica	25606 Sacha
24515 Mel	23223 Melissa
23515 Nina	23094 Raissa
25109 Peve	24502 Aparecida
23574 Roco	21772 Belinha
23353 Azulão	18120 Jack
23038 Neguinha	25518 sansão
23776 Doroti	26873 fiona
24079 Denis	26829 scooby
Externo Ripi	27663 godan
23307 Nina	27173 Diva
Externo Floquinho	27870 Geni
18808 Bud	-- 27080
12308 Bino	27674 nike
23197 Zulu	27312 meg
Externo ferida	27790 nina

Tabela 02. Histórico, achados clínico e provável fonte de infecção dos pacientes diagnosticados com botulismo.

RG - NOME	HISTÓRICO	ACHADOS CLINICO					FONTE DE INFECÇÃO		
		MEGAE SÓ FAGO	PNEUMONIA POR ASPIRAÇÃO	DISFONIA	PRODUÇÃO LACRIMAL (SCHIMMER)	DIAR RÉIA	HEMOGRAMA		
20985 Tigresa	Prop. relata que há 8 dias paciente começou com fraqueza no MP's impossibilitando o animal de andar.	Não consta informação	Não consta informação	Presente	Não consta informação	Ausente	Não consta informação	Alimentar	
18200 Mel	Iniciou com claudicação que evoluiu para paralisia de MP's, paciente tem acesso livre a rua.	Presente	Ausente	Presente	Normal OD30 OE26	Ausente	Leucocitose com neutrofilia sem desvio. PT do soro normal com hiperglobulinemia. FA e CPK aumentados	Alimentar	
20557 Lion	Após dois dias da segunda dose de ivomec animal passou a não movimentar mp's evoluindo também para ma's.	Presente	Ausente	Presente	Não consta informação	Ausente	PPT aumentado, PT do soro aumentada, hiperglobulinemia, FA e CPK aumentado	Alimentar	
21616 Pretinha	Esta sem andar há 3 dias. Alimenta-se de comida caseira e tem acesso livre a rua.	Não consta informação	Não consta informação	Ausente	Não consta informação	Presente	Leucocitose, neutrofilia com desvio, monócitos aumentado. PT aumentada, hiperglobulinemia. Ureia, creatinina e FA aumentado.	Alimentar	
22195	Há 1 dia iniciou	Ausente	Ausente	Presente	Não consta informação	Ausente	Linfopenia	Alimentar	

Dolly	com fraqueza pior em MP's. Não tem acesso a rua porém fuça em lixo, alguns dias antes foram em um sítio e animal alimentou-se de algo com mal cheiro.						informação	e			
24795 Pixica	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação
24515 Mel	Vive em chácara onde alimentou-se de algo em estado de (há 4 dias) putrefação. Iniciou com fraqueza pior em membros posteriores impossibilitando caminhar.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Normal	Ausente e	PT do soro aumentada com hiperglobulinemia.	Alimentar	
23515 Nina	Encontrada em terreno baldio em decúbito lateral sem conseguir se mover. Tem ninhada de aproximadamente 30 dias.	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Não consta informação	Ausente e	Leucocitose com neutrofilia sem desvio, PT do soro aumentada e hiperglobulinemia.	Alimentar	
23574 Roco	Iniciou fraqueza de MP's com evolução para generalizada impossibilitando caminhar. Prop. relata que o animal as vezes foge para	presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Não consta informação	Ausente e		Alimentar	

23353 Azulão	rua. Há 3 dias iniciou com andar rígido em mp's evoluindo para ma's, impossibilitando o animal de andar.	Ausente	Ausente	Ausente	Não consta informação	Ausente	Ausente	Trombocitopenico . PT do soro e FA aumentado.	Alimentar
23038 Neguinha	Após passar por cirurgia (estava a dias em trabalho de parto) foi encaminhada para clinica médica devido fraqueza generalizada	Não realizado paciente voltou a andar antes.	Ausente	Presente	Não consta informação	Ausente	Ausente	Neutrofilia sem desvio, neutrófilos hipersegmentados.	Feto putrefação
23776 Doroti	Fugiu para rua, qdo voltou apresentava cheiro de carniça, andar cambaleante e com tremores em MP's deixando de andar	Ausente	Não consta informação	Ausente	Não consta informação	Ausente	Ausente	Neutrofilia sem desvio, presença de linfócitos atípicos.	Alimentar
24079 Dénis	Passou 1 dia na rua, quando retornou apresentava fraqueza impossibilitando o paciente de andar.	Ausente	Ausente	Presente	Não consta informação	Ausente	Ausente	Neutrofilia sem desvio. Eosinofilia. Presença de linfócitos atípicos. CPK aumentado	Alimentar
EXTER NO Ripi	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Intestinal
23307 Nina	Há dois dias com feto retido no canal vaginal. Apresentando fraqueza generalizada	Ausente	Ausente	Presente	Não consta informação	Ausente	Ausente	Anemia grave. Trombocitopenia.	Feto em putrefação

	permanecendo em decúbito.	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação
EXTER NO Fioquinho	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação
18808 Bud	Animal vive em chácara. Apresentando fraqueza generalizada impossibilitando a caminhada. Pode ter tido acesso a carniça.	Não consta informação	Não consta informação	Presente	Não consta informação	Ausente	<i>Anaplasma platys</i> , Leucocitose com neutrofilia sem desvio. PT do soro aumentada com hiperglobulinemia. FA baixo.	Alimentar
25109 Peve	Paciente parou de andar de um dia para o outro, prop. não sabe se paciente sofreu algum traumatismo. Esporadicamente foge para rua.	Não consta informação	Não consta informação	Normal	Normal	Ausente	PT do soro aumentada com hiperglobulinemia.	Alimentar
25871 Scob	Paciente parou de andar há 3 dias prop. relata que 1 mês atrás apresentou andar cambaleante. Não tem acesso a rua. Alimenta-se de comida caseira.	Não consta informação	Não consta informação	Normal	18 normal	Norma	Sem alterações	Alimentar
12308 Bino	Proprietário relata que paciente ingeriu carniça há 2 dias iniciando com fraqueza e desequilíbrio. Não	Não consta informação	Não consta informação	Presente	Não consta informação	Norma	Trombocitopenia. PPT aumentada.	Alimentar

Tabela 03. Tabela neurológica mostrando a apresentação clínica, reações posturais, reflexos segmentares, déficits de nervos cranianos e presença ou não do pânico em pacientes com botulismo.

RG - PACIENTE	APRESENTAÇÃO CLÍNICA	REÇÕES POSTURAIS			REFLEXOS SEGMENTARES			NERVOS CRANIANOS	PANÍCULO
		PROPRIOCEÇÃO	SALTITAR	RETIRADA	PATELAR	RETIRADA	PATELAR		
20985 Tigresa	Fraqueza generalizada evoluindo para tetraparesia flácida pior em MP's	MP's normal MA's normal	MP's diminuído MA's diminuído	MP's diminuído MA's diminuído	MPE diminuído MPD diminuído	MPE diminuído MPD diminuído	VII	Normal	
18200 Mel	Fraqueza dos membros evoluindo para tetraparesia flácida	Não informação	consta	Não consta informação	MPE ausente MPD ausente	MPE ausente MPD ausente	Ausência de déficits	Não consta informação	
20557 Lion	Fraqueza de MP's evoluindo para tetraparesia flácida	MP's diminuído MA's diminuído	MP's ausente MA's ausente	MP's normal MA's normal	MPE ausente MPD ausente	MPE ausente MPD ausente	VII	Normal	
21616 Pretinha	Fraqueza generalizada estando sem andar	Não informação	consta	Não consta informação	MPE ausente MPD ausente	MPE ausente MPD ausente	Não consta informação	Não consta informação	
22195 Dolly	Dificuldade locomotora com fraqueza pior em MP's.	MP's normal MA's normal	MP's diminuído MA's normal	MP's ausente MA's diminuído	MPE ausente MPD ausente	MPE ausente MPD ausente	VII	Normal	
24795 Pixica	Não consta informação	Não informação	consta	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação	
24515 Mel	Fraqueza generalizada pior em MP's, piora com exercício.	MP's normal MA's normal	MP's normal MA's normal	MP's diminuído MA's normal	MPE diminuído MPD diminuído	MPE diminuído MPD diminuído	VII	Normal	
23515 Nina	Encontrada na rua com tetraparesia flácida, sem se mover.	MP's diminuído MA's diminuído	MP's diminuído MA's diminuído	MP's ausente MA's diminuído	MPE diminuído MPD diminuído	MPE diminuído MPD diminuído	VII	Ausente	
23574 Roco	Fraqueza generalizada pior em MP's	MP's diminuído MA's diminuído	MP's diminuído MA's diminuído	MP's diminuído MA's diminuído	MPE diminuído MPD diminuído	MPE diminuído MPD diminuído	Ausência de déficits	Normal	
23353 Azulão	Fraqueza de membros posteriores há 3 dias evoluindo para tetraparesia flácida	MP's diminuído MA's normal	MP's diminuído MA's normal	MP's diminuído MA's normal	MPE diminuído MPD diminuído	MPE diminuído MPD diminuído	VI VII	Normal	
23038 Neginha	Fraqueza generalizada com tetraparesia flácida	MP's normal MA's normal	MP's diminuído MA's diminuído	MP's diminuído MA's diminuído	MPE diminuído MPD diminuído	MPE diminuído MPD diminuído	VI VII	Ausente	

Tabela 04. Evolução neurológica dos pacientes com botulismo no período de internação no HOVET					
RG - NOME	APRESENTAÇÃO ADMISSÃO HOSPITALAR	NEUROLÓGICA NA	TEMPO PARA RETORNO DA ATIVIDADE REFLEXA PATELAR	TEMPO PARA NORMALIZAÇÃO DOS DÉFICITS DE NERVOS CRANIANOS	TEMPO PARA DEAMBULAÇÃO NORMAL
20985 Tigresa	Tetraparesia flácida não ambulatorial		4 dias	1 dia	6 dias
18200 Mel	Tetraparesia flácida não ambulatorial		7 dias	Ausência de déficits	8 dias.
20557 Lion	Tetraparesia flácida não ambulatorial		9 dias	1 dia	12 dias
21616 Pretinha	Tetraparesia flácida não ambulatorial		11 dias ainda diminuído (fichas extraviadas)	Não consta informação	Não consta informação
22195 Dolly	Tetraparesia flácida ambulatorial		8 dias	2 dias	6 dias
24795 Pixica	Não consta informação		Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação
24515 Mel	Tetraparesia flácida não ambulatorial		5 dias	2 dias	6 dias
23515 Nina	Tetraparesia flácida ambulatorial		8 dias	8 dias	13 dias (recebeu alta, andar rígido)
23574 Roco	Tetraparesia flácida não ambulatorial		6 dias	Ausência de déficits	7 dias
23353 Azulão	Tetraparesia flácida não ambulatorial		5 dias	3 dias	7 dias
23038 Neguinha	Tetraparesia flácida não ambulatorial		5 dias	4 dias	8 dias
23776 Doroti	Tetraparesia flácida não ambulatorial		1 dia	9 dias	12 dias (recebeu alta, andar rígido)
24079 Dênis	Tetraparesia flácida não ambulatorial		11 dias	8 dias	15 dias
EXTERNO Ripi	Não consta informação		Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação
23307 Nina	Tetraparesia flácida não ambulatorial		8 dias	Ausência de déficits	10 dias
EXTERNO Floquinho	Não consta informação		Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação
18808 Bud	Tetraparesia flácida não ambulatorial		8 dias	10 dias	20 dias
25109 Peve	Tetraparesia flácida não ambulatorial		8 dias	Ausência de déficits	10 dias
25871 Scooby	Tetraparesia flácida não ambulatorial		23 dias (alta devido a recesso hospitalar sem normalização do reflexo)	Ausência de déficits	21 dias
12308 Bino	Tetraparesia flácida ambulatorial. Prop não autorizou internação.		Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação
23197 Zulu	Tetraparesia flácida não ambulatorial		10 dias	Ausência de déficits	17 dias
Externo sem nome	Tetraparesia flácida		Não consta informação	Não consta informação	Não consta informação