



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**



**BOTULISMO EM BOVINOS E OVINOS:
EPIDEMIOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA,
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL, ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO,
CONTROLE E PREVENÇÃO**

JULIANA PANIAGO LORDELLO DE PAULA

Campo Grande – MS
2021

JULIANA PANIAGO LORDELLO DE PAULA

**BOTULISMO EM BOVINOS E OVINOS:
EPIDEMIOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA,
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL, ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO,
CONTROLE E PREVENÇÃO**

*Botulism in cattle and sheep: epidemiology, clinical characterization,
laboratory diagnosis, differential diagnosis, treatment strategies, control
and prevention*

JULIANA PANIAGO LORDELLO DE PAULA

Orientador: Ricardo Antonio Amaral de Lemos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS
2021

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
PARECER CONSUBSTANCIADO

1. IDENTIFICAÇÃO:

1.1 **Título:** Botulismo em bovinos e ovinos confinados: epidemiologia, caracterização clínica, diagnóstico laboratorial e estratégias de tratamento, prevenção e controle.

1.2 **Protocolo:** 910/2017 Nº Processo 23104.018127/2017-79

1.3 **Pesquisador Responsável:** Ricardo Antonio Amaral de Lemos

1.4 **Instituição:** UFMS/ FAMEZ

2. OBJETIVOS:

- Desenvolver um modelo experimental de reprodução do botulismo em ovinos e bovinos;
- Estabelecer protocolos de tratamento para o botulismo;
- Avaliar a eficácia de um protocolo de vacinação para estas espécies animais submetidas a condições de elevados riscos da doença;
- Avaliar o efeito da luz solar sobre a inativação da toxina botulínica em alimento contaminado;
- Descrever o surto de botulismo em bovinos de confinamento.

3. ANÁLISE DOS ASPECTOS FORMAIS DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

3.1 **Justificativa:** A intoxicação pela toxina botulínica é relevante para animais de produção e há carência de informações sobre protocolos vacinais e de tratamento para ovinos, assim como são escassos os relatos de surtos em bovinos no Brasil, apesar de ser uma das principais causas de mortalidade. O modelo experimental com ovinos e bovinos é justificado pelo fato dos testes de controle de qualidade de vacinas, realizados em cobaias, não avaliarem a magnitude e a duração da resposta antigênica e tampouco se esta imunidade é suficiente para proteger os animais expostos a elevado desafio.

3.2 **Metodologia:** O estudo será realizado em dois experimentos com delineamento descrito a seguir em que serão utilizados 21 ovinos ou 21 bovinos em cada. Para cada experimento, os 21 animais serão divididos em quatro grupos: 1) receberá milho contaminado e os que adoecerem serão tratados com 50.000 UI de soro anti-botulínico (n=6), 2) receberá milho contaminado e serão expostos ao sol por 8 horas, em caso de apresentação dos sinais clínicos os mesmos serão tratados com 100.000 UI de soro anti-botulínico (n=6), 3) receberá vacinação conforme protocolo do fabricante (n=6) e 4)

controle (n=3). A fonte de toxina botulínica será milho reidratado proveniente de um silo que causou um surto ocorrido em um confinamento em 2017. Os animais dos grupos 1, 2 e 3 serão vacinados segundo as recomendações do fabricante, com reforço 30 dias após a primeira dose. Amostras de sangue serão coletadas nos dias zero, +30 e ao término do estudo, para a determinação de anticorpos contra as toxinas C e D. O protocolo de tratamento com soro antitoxinotico será avaliado nos animais dos grupos 1, 2 e 3, que apresentarem sinais clínicos.

3.3 Cronograma de Execução: Início do protocolo em 01 de novembro de 2017 – Fim 01/11/2018. Início do uso de animais em 01/11/2017. *Em 8/01/2018, início com animais.*

PARECER DOS RELATORES:

☒ Aprovado

☐ Aprovado com recomendação (descrever o quesito a ser atendido e que não é impeditivo para o início da pesquisa):

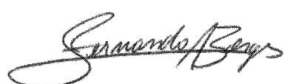
☐ Pendente (aprovação condicionada à atendimento prévio das solicitações feitas – relacionar):

☐ Não aprovado

☐ Retirado (descrever a razão):

Essa subcomissão é de parecer favorável à aprovação do projeto de pesquisa, pois os procedimentos que envolvem os animais não ferem à ética e aos preceitos legais do CONCEA.

Campo Grande, 7 de novembro de 2017.



Fernando de Almeida Borges
Relator sub-comissão



Fábio José Carvalho Faria
Secretário sub-comissão

RESUMO

O sistema de confinamento de bovinos de corte é uma atividade que possibilita redução na idade de abate dos animais, maior produção por área e aumento da qualidade da carne. Existem poucos estudos sobre causas de mortalidades em bovinos confinados no Brasil, sendo as doenças respiratórias e os transtornos digestórios os principais problemas sanitários nesse sistema de produção e distúrbios neurológicos menos frequentes. A raiva é descrita de forma esporádica como causa de mortes em confinamentos de bovinos e surtos de botulismo com importantes perdas econômicas são relatados. Capítulo 1 - o objetivo foi descrever a epidemiologia, o quadro clínico, os procedimentos de diagnósticos, diagnósticos diferenciais de casos experimentais de botulismo em ovinos, respectivamente, e avaliar protocolos de prevenção e tratamento da doença. Foram realizados dois experimentos para a reprodução da doença em ovinos utilizando milho re-hidratado que foi associado a surto espontâneo de botulismo em bovinos. No primeiro modelo, foram utilizados 18 animais, e não foi possível reproduzir a doença. No segundo modelo experimental, foi administrado, via oral, a quatro ovinos, dois deles vacinados contra botulismo, mistura de restos de animais provenientes de um surto de botulismo e solução fisiológica, os quais apresentaram sinais clínicos de botulismo e foram tratados com soro anti-botulínico, mas três tiveram evolução fatal. Capítulo 2 - o objetivo foi descrever um surto de botulismo em bovinos confinados, demonstrando as dificuldades no diagnóstico e tratamento do botulismo nesta espécie. Um surto de botulismo em bovinos confinados alimentados com silagem de milho contaminada com neurotoxina de *Clostridium botulinum* tipo C (BoNT/C) ocorreu no Centro-Oeste do Brasil em agosto de 2017. O início do surto ocorreu 15 dias após 1700 bovinos começarem a ser alimentados com os contaminados silagem de milho. Um total de 1100 bovinos foram afetados, 1090 dos quais morreram em quatro dias. Dez bovinos se recuperaram após o tratamento com antitoxina. Nenhuma lesão macroscópica ou microscópica foi encontrada nos bovinos afetados. O diagnóstico foi baseado em dados epidemiológicos, sinais clínicos característicos e resultados positivos de bioensaios em camundongos. Capítulo 3 - o objetivo foi descrever um surto de raiva em bovinos confinados enfatizando a importância do diagnóstico diferencial e do estabelecimento de protocolos sanitários para prevenção. O surto ocorreu no estado de Mato Grosso do Sul, em um confinamento no qual morreram oito animais, sendo quatro necropsiados na propriedade e um encaminhado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os animais não eram vacinados contra raiva. Os animais apresentaram sinais neurológicos e um animal apresentou prurido com auto-mutilação. Dos animais necropsiados todos tiveram achados de necropsia semelhantes caracterizados por bexiga repleta, leptomeninges moderadamente hiperêmicas e no exame histopatológico manguitos perivasculars de linfócitos e plasmócitos, discreta gliose e no citoplasma de neurônios havia de inclusões eosinofílicas compatíveis com corpúsculos de Negri. Todos os animais examinados foram positivos para raiva na imunofluorescência direta.

Palavras-chave: doenças de confinamento, *Clostridium botulinum*, raiva, ruminantes, reprodução experimental.

ABSTRACT

The use of feedlot system in beef cattle reduces animals' slaughter age and improves productivity and meat quality. There are few studies regarding causes of mortality in cattle raised in this system in Brazil. Respiratory and digestive disorders are the main problems affecting these animals; neurological disorders are less common. Rabies has sporadic occurrence in feedlots and botulisms outbreaks have caused important losses. Chapter 1 – aims to describe epidemiology, clinical aspects, diagnostic procedure, and differentials diagnoses of experimental cases of botulism in sheep, and to evaluate prevention and treatment protocols. Two experimental trials were made to reproduce the disease in sheep, using a re-hydrated corn that was previously associated to an

outbreak in cattle. In the first study, 18 animals were used, and it was not possible to reproduce the disease. In the second experiment, four sheep received, orally, saline solution with carcasses of cattle that had died from botulism. Two of the four sheep were previously vaccinated against the disease. The four sheep got sick and were treated with commercial antitoxin, but three of them died. Chapter 2 – aims to describe a botulism outbreak occurred in feedlot cattle, showing diagnosis and treatment barriers of the disease in this situation. A large outbreak of botulism took place in Midwestern Brazil in August 2017, with feedlot steers fed with corn silage, contaminated with *Clostridium botulinum* neurotoxic type C (BoNT/C). The onset of the outbreak occurred 15 days after 1,700 steers started to be fed with contaminated corn silage. A total of 1,100 steers were affected and 1,090 of them died within four days. Ten steers recovered after being treated with antitoxin. No gross or microscopic lesions were found in affected steers. The diagnosis was based on epidemiological data, characteristic clinical signs, and positive mouse bioassay results. Chapter 3 – aims to describe a rabies outbreak in feedlot cattle, reinforcing the importance of differential diagnosis and institution of preventive protocols. The outbreak occurred in Mato Grosso do Sul, Midwestern Brazil, and eight cattle died; four were necropsied on site, and four were sent to the Federal University of Mato Grosso do Sul. These animals were not vaccinated against rabies. Animals presented neurological disorders, and one also showed self-inflicted trauma. The necropsy findings were similar in all animals – enlarged urinary bladder and hyperemic leptomeninges. Microscopic findings were perivascular infiltrate of lymphocytes and plasm cells, mild gliosis, and intracytoplasmic inclusion bodies in neurons (Negri bodies). All eight were positive in direct immunofluorescence test.

Keywords: feedlot diseases, Clostridium botulinum, rabies, ruminants, experimental trial

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Outbreak of botulism in feedlot cattle. Flaccid paralysis. The lack of tonus in the limbs prevents the steer from standing	26
Figure 2. Outbreak of botulism in feedlot cattle. Flaccid paralysis causes the tongue to protrude from the mouth	26
Figura 3. Surto de raiva em bovinos confinados. Prurido com automutilação na região da cabeça, pescoço e nuca	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento experimental de protocolos de indução, prevenção e tratamento de botulismo em 18 ovinos	11
Tabela 2. Delineamento experimental de protocolos de indução e prevenção de botulismo em quatro ovinos	12

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
Abstract.....	ii
CAPÍTULO 1	2
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
4. MATERIAIS E MÉTODOS	10
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSSÃO	14
7. CONCLUSÃO	16
8. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO 2	24
ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>Anaerobe</i> com o título “Surto de botulismo tipo C em bovinos confinados alimentados com silagem de milho contaminada”.....	24
CAPÍTULO 3	34
ARTIGO A SER PUBLICADO NA REVISTA <i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i> com o título “Raiva em bovinos confinados”.....	34
CAPÍTULO 4	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS	43

77 **CAPÍTULO 1**

78

79 **1 INTRODUÇÃO**

80 No Brasil o setor do agronegócio movimentou no ano de 2020
81 aproximadamente 1,97 bilhão de reais, de acordo com o Centro de Estudos
82 Avançados em Economia Aplicada da Escola Superior de Agricultura Luiz de
83 Queiroz, Universidade de São Paulo. A pecuária brasileira acumula
84 crescimento expressivo a cada ano e, em 2020, o rebanho bovino nacional
85 correspondeu ao segundo maior do mundo, com cerca de 244 milhões de
86 animais, tendo o país sido o maior exportador de carne bovina (USDA, 2020).
87 Desse total, aproximadamente 75 milhões de animais encontram-se na região
88 Centro-Oeste, e o estado de Mato Grosso do Sul detém o 5º maior rebanho no
89 país, totalizando aproximadamente 20 milhões de animais (IBGE, 2018).
90 Estima-se que pelo menos 5% dos bovinos morram anualmente por diferentes
91 causas (PESSOA et al., 2013), logo o conhecimento das doenças que afetam
92 esta espécie é essencial para reduzir as perdas econômicas ligadas à
93 categoria.

94 Atualmente o sistema de confinamento bovino tem sido uma alternativa
95 muito utilizada com intuito de reduzir o período de terminação dos animais e
96 aumentar o número de cabeças por área (MALAFAIA et al., 2016). Entretanto
97 este tipo de produção intensiva pode acarretar em aumento no número de
98 doenças, necessitando de diagnósticos precisos para combater-las. Estudos
99 retrospectivos apontam que as doenças que afetam o sistema nervoso
100 compreendem a maior parte das enfermidades que acometem bovinos no
101 Brasil. Dentre os principais diagnósticos estão raiva, meningoencefalites não
102 supurativas de causa indeterminada, meningoencefalite por *Herpesvírus* bovino
103 e botulismo (LUCENA et al., 2010; RONDELLI et al., 2017; PUPIN et al., 2019).

104 A raiva e o botulismo são doenças comuns em bovinos e podem
105 acometer todas as espécies de mamíferos, principalmente bovinos, ovinos,
106 caprinos e equinos (BARROS et al., 2006; MEGID et al., 2016). Ambas são
107 causas de mortalidade em bovinos, sobretudo em criações extensivas

108 (LUCENA et al., 2010; RONDELLI et al., 2017; PUPIN et al., 2019), surtos em
109 sistemas intensivo e semi-intensivo podem afetar grande número de bovinos
110 causando sérios prejuízos econômicos (BRAGA et al., 2013; GUIZELINI et al.,
111 2018; SOARES et al., 2018).

112 Formas para evitar prejuízos econômicos são baseadas no manejo do
113 rebanho bovino, como a vacinação com protocolos adequados dos animais,
114 suplementação mineral adequada e remoção de carcaças do pasto, visto que
115 não há tratamento específico disponível que combata a enfermidade. O
116 conhecimento da epidemiologia da doença é um dos principais pontos para que
117 se instituem formas de prevenção adequadas, de forma que é fundamental que
118 tais informações sejam de amplo conhecimento dos produtores rurais e
119 médicos veterinários que atuam diretamente no campo.

120 O objetivo do presente trabalho é descrever a epidemiologia, o quadro
121 clínico, os procedimentos de diagnósticos de casos espontâneos e
122 experimentais de botulismo em bovinos e ovinos, respectivamente, avaliando
123 protocolos de controle, prevenção e tratamento, e descrever um surto de raiva
124 em bovinos confinados, que é um diferencial para botulismo.

125 2 OBJETIVOS

126 2.1 OBJETIVO GERAL

127 O objetivo do presente trabalho é descrever a epidemiologia, o quadro
128 clínico, os procedimentos de diagnósticos de casos espontâneos e
129 experimentais de botulismo em bovinos e ovinos, respectivamente, avaliando
130 protocolos de prevenção e tratamento, e descrever um surto de raiva em
131 bovinos confinados, que é um diferencial para botulismo.

132

133 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 134 1. Desenvolvimento de um modelo experimental para reprodução do
135 botulismo em ovinos e bovinos;
- 136 2. Estabelecimento de protocolos de tratamento do botulismo em ovinos
137 e bovinos;
- 138 3. Descrição de um surto de botulismo em bovinos de confinamento;
- 139 4. Avaliação da eficácia de um protocolo de vacinação em ovinos e
140 bovinos submetidos a condições de elevado risco de
141 desenvolvimento da doença;
- 142 5. Descrever um surto de raiva em bovinos confinados, doença
143 diferencial para botulismo.

144

3 REVISÃO DE LITERATURA

O botulismo, uma intoxicação não febril e altamente fatal, que acomete humanos e animais causada pela bactéria Gram positiva *Clostridium botulinum*, foi primeiramente descrito em 1793 na Alemanha por Dickson (1918) (citado por SCHOCKEN-ITURRINO, 1980). Essa é uma intoxicação não febril e altamente fatal que acomete humanos e animais (KRIEK e ONDENDAAL, 2004; HOGG et al., 2008; LE MARÉCHAL et al., 2016).

O *C. botulinum*, por ser incapaz de sintetizar aminoácidos essenciais, necessita de substratos ricos em proteínas para se desenvolver. Matérias orgânicas (animal e vegetal) em decomposição fornecem condições ideais para o seu crescimento, e seus esporos podem permanecer viáveis durante anos, pois são altamente resistentes, álcoois, desinfetantes, temperatura e pH altos (TAVELLA et al., 2014; LE MARÉCHAL et al., 2016).

Existem sete tipos de toxinas botulínicas (A a G) que embora antigenicamente distintas, possuem modo de ação semelhante (LE MARÉCHAL et al., 2016). A ocorrência da doença está relacionada à sensibilidade das espécies e ao tipo e quantidade de toxina botulínica ingerida. Em humanos, casos de botulismo são causados pelas toxinas do tipo A, B, E e, raramente, F; em bovinos, são causados pela ingestão de neurotoxinas tipos C e D (LE MARÉCHAL et al., 2016). As condições de produção adequadas da toxina botulínica dependem da ausência de oxigênio, da temperatura ideal (25-42°C), da umidade, bem como a ausência de incidência de luz solar, pois esta inativa a toxina (DUTRA, 1994; MEGID et al., 2016).

Após a ingestão das toxinas, estas são absorvidas no intestino e, através das correntes sanguínea e linfática, são transportadas aos neurônios sensíveis, atuando nas junções neuromusculares, acarretando na paralisia funcional motora sem interferência com a função sensorial. Afetam o sistema nervoso periférico, pelo bloqueio da sinapse ao impedir a liberação de acetilcolina, impedindo a passagem dos impulsos do nervo para o músculo, e consequentemente causando paralisia flácida (KRIEK e ONDENDAAL, 2004; NUM e USEH, 2014; LE MARÉCHAL et al., 2016).

O botulismo em bovinos foi relatado primeiramente em 1927 por Theiler (LE MARÉCHAL et al., 2016) e, atualmente, é uma doença descrita em diversos países como Itália, Holanda, África do Sul, Reino Unido, Japão, França e Turquia, causada pela ingestão da toxina em água, em alimentos contaminados ou pela osteofagia praticada pelos animais (WHO, 2002; SENTURK e CIHAN, 2007; VAN DER BURGT et al., 2007; CAMERON, 2009; LINDSTRÖM et al., 2010; NAKAMURA et al., 2010; LE MARÉCHAL et al., 2019).

No Brasil, o botulismo foi relatado pela primeira vez, em bovinos, em 1970 por Tokarnia et al., na época conhecida por “doença da mão dura”. Pelo fato da bactéria *C. botulinum* ser comumente encontrada no trato digestivo dos animais, sua disseminação em pastagens por fezes de animais é facilitada (LE MARÉCHAL et al., 2016; MEGID et al., 2016). A doença é descrita nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, onde 703 casos foram diagnosticados em bovinos por técnicos do Setor de Anatomia Patológica do Núcleo de Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e do Laboratório de enfermidades infecciosas do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba, no período 2000 e 2003 (LE MOS, 2005). Em países da Europa, Brasil, África do Sul, Austrália e a área costeira do Golfo nos Estados Unidos, onde a deficiência de fósforo é uma condição frequente, a osteofagia é o principal fator de risco para a ocorrência da doença em sistemas de criação extensiva (RADOSTITS, 2001; CAMERON, 2009; NUM e USEH, 2014). Outras condições, como ingestão de água com carcaças de animais ou consumo de cereais como milho, feno e silagem malconservados, ou contendo restos de carcaças de animais também são associadas ao aparecimento de casos (GALEY et al., 2000; KELCH et al., 2000; DUTRA et al., 2005; LOBATO et al., 2008; MABONI et al., 2010).

Embora a doença seja considerada uma das principais causas de mortalidade em bovinos criados extensivamente no Brasil (DÖBEREINER et al., 1992), com morbidade e mortalidade variando de 3,47 a 100%, e letalidade de 60,52% a 100% (DUTRA et al., 2001; MARTIN, 2003; DUTRA et al., 2005; COSTA et al., 2008; CÂMARA et al., 2014; TAVELLA et al., 2014; LE

208 MARÉCHAL et al., 2016; NOBRE et al., 2019), a realidade brasileira diante
209 dessa enfermidade em produção intensiva não é muito bem relatada, pois são
210 escassos os relatos de surtos nestes sistemas de criação, embora animais em
211 confinamentos também sejam propensos à intoxicação botulínica, devido aos
212 riscos de intoxicações através de alimentos contaminados, mal conservados,
213 com matéria orgânica em decomposição ou com cadáveres pequenos que
214 geram condições ideais para multiplicação bacteriana e produção da toxina
215 (GALEY et al., 2000; DUTRA et al., 2005; MABONI et al., 2010; RASETTI-
216 ESCARGUEIL et al., 2020).

217 Para que ocorra o botulismo alguns fatores devem ser levados em
218 consideração como a intensidade da contaminação ambiental, presença de
219 matéria orgânica em decomposição, e condições ideais para proliferação da
220 bactéria e produção da toxina (DUTRA et al., 2001). Sabe-se que 1g de toxina
221 botulínica é capaz de matar 400.000 bovinos adultos (LE MARÉCHAL et al.,
222 2016), portanto a contaminação do substrato não precisa ser massiva para
223 causar a doença. Ademais, o período de incubação e a evolução da doença
224 estão associados, ou seja, quanto maior a quantidade de toxinas ingeridas,
225 menor é o período de incubação e mais severos serão os sinais clínicos
226 (MEGID et al., 2016). Ainda, doses não letais fornecidas por um longo período
227 podem causar a doença, entretanto, ao final estas são maiores do que quando
228 administradas em dose única (KRIEK e ODENDAAL, 2004).

229 Surtos de botulismo ocorrem em todos os meses do ano (LE MOS, 2005;
230 CÂMARA et al., 2014; NOBRE et al., 2019; SANTOS et al. 2019), mas são
231 mais frequentes durante os meses de outubro a maio, quando as condições
232 são próximas à temperatura ideal para o crescimento bacteriano e há maior
233 necessidade de fósforo, devido à alta oferta de proteína (BARROS et al., 2006;
234 RIBAS et al., 2013). Água e pH também são descritos como fatores de risco
235 para a germinação de esporos de *C. botulinum* e posterior produção de toxinas.
236 Considera-se que o risco de ocorrência de botulismo é elevado quando o pH da
237 matéria orgânica contaminada está entre 7,5 e 9,5, e a temperatura da água de
238 20°C. Alimentos destinados ao consumo animal que não passaram por
239 processo de acidificação favorecem a proliferação de *C. botulinum* e a

produção de toxinas. Dessa forma, silagem com pH superior a 4,5 é considerada como fator de risco. Grãos, feno e silagem podem ser contaminados por matéria orgânica durante a colheita e o armazenamento inadequados, tornando-se sujeitos a decomposição, devido às condições ideais de umidade, temperatura e anaerobiose para o crescimento da bactéria. O uso de misturadores e equipamentos para a distribuição do alimento aumenta o risco de disseminação da parte contaminada, mesmo que esta seja pequena (LE MARÉCHAL et al., 2016). Apesar destas condições favoráveis ao desenvolvimento da bactéria, é importante salientar que a toxina botulínica é sensível ao calor e dessecação, sendo rapidamente inativada pela luz solar e, por conta disso, os esporos se concentram no interior dos ossos (RIET-CORREA e FERNANDES, 2007).

Não existem sinais patognomônicos para o botulismo, mas o quadro clínico apresentado pelos animais é sugestivo, principalmente quando o animal apresenta dificuldade respiratória, marcada pela respiração abdominal bifásica (inspiração mais longa que a expiração). Na maioria dos ruminantes, há paralisia flácida progressiva, iniciando-se nos membros pélvicos, incoordenação, incapacidade de levantar, decúbito esternal evoluindo para lateral, estado mental normal, hipotonicidade da cauda e língua com consequente disfagia e sialorreia (BRAUN et al., 2005; BARROS et al., 2006; LE MARÉCHAL et al., 2016).

O diagnóstico de botulismo pode ser realizado baseando-se nos dados epidemiológicos (ingestão de matéria orgânica animal ou vegetal, como feno em decomposição, silagem em condições inadequadas, restos de carcaças expostas nas pastagens e em fontes de água), no quadro clínico, na ausência de lesões macro e microscópicas significativas e na eliminação de outras possíveis causas dos sinais apresentados (BARROS et al., 2006; LE MARÉCHAL et al., 2016).

A confirmação é realizada pela detecção e identificação da toxina botulínica através das provas de bioensaio e soroneutralização em camundongos, consideradas como padrão ouro para diagnóstico do botulismo. São injetadas, via intraperitoneal, pequenas doses de diluições de amostras, e

caso haja a toxina, os camundongos apresentarão sinais característicos de botulismo (LINDSTRÖM e KORKEALA, 2006). As amostras encaminhadas são provenientes de animais doentes, especificamente 250g de conteúdo intestinal e conteúdo ruminal, e fragmentos de fígado refrigerados ou congelados (LOBATO et al., 2007). Apesar de ser um teste sensível e específico, alguns fatores podem mascarar os resultados do diagnóstico final. As toxinas produzidas pelo *C. botulinum* são proteínas e, portanto, são facilmente degradadas no rúmen e no intestino, requerendo atenção com o tempo entre a morte e a necropsia do animal, não devendo ultrapassar três horas, e com o modo de coleta do material, sendo preconizada o envio do conteúdo ruminal e intestinal no interior dos órgãos (ALLISON et al., 1976; ANNIBALLI et al., 2013; LE MARÉCHAL et al., 2016; SILVA et al., 2016). Logo, um resultado negativo nas provas de bioensaio e soroneutralização em camundongos não exclui a possibilidade de ocorrência de botulismo, pois a toxina botulínica no organismo dos animais pode apresentar níveis inferiores ao limite para a detecção através do teste (MENEGUCCI et al., 1998; DUTRA, 2001; HEIDER et al., 2001).

Os principais diagnósticos diferenciais incluem outras doenças que causam distúrbios neurológicos, dentre as quais se destacam a raiva, principal diferencial e pouco descrita em confinamentos (OLIVEIRA et al., 2012; ESTIMA-SILVA et al., 2020), a listeriose (RISSI et al., 2010), causas de polioencefalomalacia (SANT'ANA et al., 2010), babesiose cerebral (BARROS et al., 2006) – as quais podem ser confirmadas através de exames macro e microscópicos, intoxicações por organofosforados (CASTRO et al., 2007) e intoxicações por micotoxinas produzidas pelo fungo *Aspergillus clavatus* (LORETTI et al., 2003) - confirmadas através dos dados epidemiológicos. Outras doenças que acometem os músculos podem ser consideradas no diagnóstico diferencial, porque o quadro clínico pode ser semelhante; dentre elas estão as intoxicações por plantas do gênero *Senna* sp. (CARVALHO et al., 2014) reconhecidas pela presença da planta e lesões macro e microscópicas características, e por antibióticos ionóforos (NOGUEIRA et al., 2009) confirmados pelos dados epidemiológicos, também devem ser consideradas para definir um diagnóstico correto.

A proteção vacinal contra botulismo pode ser bastante eficiente, desde que a vacinação seja feita da maneira preconizada, entretanto, alguns fatores podem minimizar esta eficiência, como a quantidade ingerida da neurotoxina. Quando a vacinação do rebanho com toxoides bivalentes C e D é associada à redução da exposição dos bovinos à neurotoxina botulínica, a taxa de proteção contra a doença pode chegar a 96% (CURSI et al., 2013). Para isso, preconiza-se o protocolo de vacinação com duas doses, que consiste em primovacinação seguida de reforço vacinal após 4 a 6 semanas, e revacinação anual (GASPAR et al., 2015).

Sistemas intensivos de produção de bovinos possuem alto risco para ocorrência de doenças causadas por bactérias do gênero *Clostridium*, como carbúnculo sintomático, enterotoxemias, tétano e botulismo (REZENDE et al., 2014; MARTINS, 2016) assim, a imunização dos animais com vacinas polivalentes deve ser considerada uma estratégia importante para prevenção dessas doenças. Com intuito de evitar gastos e manejo dos animais, grande parte dos pecuaristas optam pela não imunização dos animais com vacinas não obrigatórias, mas segundo Soares et al. 2018 a despesa com duas doses de vacinas polivalentes pode chegar a apenas R\$ 1,96 por animal, um custo muito menor do que a morte de animais como em um surto de botulismo, além de reduzir os riscos de ocorrência de outras clostridioses.

Não existe um tratamento específico para botulismo e normalmente a eutanásia dos animais com quadro clínico severo é recomendada (BARROS et al., 2006). Em casos mais brandos ou iniciais, pode ser realizado o tratamento através da administração de antitoxina, que deve ser feito o quanto antes, pois esta é ineficaz quando a toxina já está fixada nas junções neuromusculares (SIMPSON, 1981; LE MARÉCHAL et al., 2016). Os casos de recuperação espontânea ou com tratamento são explicados pela formação de novas terminações nervosas no organismo, tornando o animal hábil para uma vida normal (DUCHEN, 1972).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTO 1 - FORNECIMENTO DE MILHO RE-HIDRATADO CONTENDO TOXINA BOTULÍNICA PROVENIENTE DE SURTO, A OVINOS

Foi realizado um experimento em ovinos, no qual foram avaliados protocolos de prevenção e tratamento do botulismo. Foram utilizados 18 animais, machos e fêmeas, mestiços, com aproximadamente 12 meses de idade, divididos em três grupos, cada um com seis animais. Os animais foram mantidos em baias individuais com área de 2,0 m², sendo alimentados com silagem de milho (1% PV), ração concentrada à base de milho (2% PV) e água à vontade. Foram submetidos a exame físico antes do início do experimento, com realização de novo exame se apresentassem sinais clínicos da intoxicação. Foram avaliadas alterações de comportamento, coloração de mucosas, movimentos respiratórios, ruminais e temperatura.

O delineamento experimental está descrito na Tabela 1. Um dia antes do início do experimento, os ovinos foram pesados e submetidos a coleta de 5 ml de sangue através de venopunção jugular para a realização de hemograma e exames bioquímicos (aspartato aminotransferase, gama glutamiltransferase, ureia e creatinina), e coleta de fezes para realização de exames parasitológicos, a fim de comprovar a higidez dos mesmos. Os animais foram vacinados contra botulismo conforme preconizado do fabricante, em duas doses, sendo a segunda (reforço), 30 dias após a aplicação da primeira dose.

Tabela 1. Delineamento experimental de protocolos de indução e prevenção de botulismo em 18 ovinos.

Grupo	Protocolo de vacinação	Fonte de toxina
1	Não vacinados	Milho re-hidratado contaminado
2	Vacinados 30 dias antes do início do experimento. Reforço no dia 0 do experimento.	Milho re-hidratado contaminado
3 (Controle)	Não vacinados	Milho re-hidratado não contaminado

A fonte da toxina botulínica utilizada foi milho reidratado coletado durante um surto acompanhado em um confinamento, no qual foi realizado teste para detecção da toxina, com resultado positivo para toxina botulínica tipo

C (GUIZELINI et al. 2019). Esse milho foi acondicionado em bolsas plásticas e mantido ao abrigo da luz solar.

O milho contendo a toxina botulínica foi fornecido na quantidade de 2% do peso vivo, no cocho, até que os sinais clínicos tivessem início. O grupo controle recebeu o milho na mesma quantidade, mas através de cânulas ruminais, juntamente com 0,5g/kg de bicarbonato de sódio, com a finalidade de evitar acidose ruminal.

Ovinos que apresentaram evolução fatal foram necropsiados e fragmentos de diversos órgãos foram coletados para exame histopatológico. Amostras de intestino delgado com conteúdo, conteúdo ruminal e fígado foram coletados e congelados para a realização de prova biológica e técnica de soroneutralização, conforme a técnica descrita por Dutra (2001).

O experimento foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS), protocolo número 910/2017.

4.2 EXPERIMENTO 2 - FORNECIMENTO DE MISTURA DE RESTOS DE ANIMAIS E SOLUÇÃO FISIOLÓGICA A OVINOS

Ossos e conteúdo ruminal de carcaças bovinas provenientes de um surto de botulismo com confirmação laboratorial pelas provas biológica e de soroneutralização foram desenterrados, imersos em solução fisiológica e armazenados em dois recipientes vedados, sem incidência de luz solar por sete dias (10kg de conteúdo ruminal em 15 litros de solução e 22kg de ossos em 30 litros de solução). Após este período, 100ml da solução sobrenadante foram administrados por via oral forçada a quatro ovinos (Tabela 2).

Tabela 2. Delineamento experimental de protocolos de indução e prevenção de botulismo em quatro ovinos.

Ovino	Vacinação	Fonte da toxina
01	Não	Conteúdo ruminal com solução fisiológica
02	Sim	
03	Não	Ossos com solução fisiológica

04	Sim	
----	-----	--

391

392 A administração foi suspensa no momento em que foram percebidos os
 393 sinais clínicos. Os ovinos foram tratados com soro antibotulínico comercial
 394 (Botulin C-D®) no momento em que manifestaram sinais clínicos característicos
 395 da doença, como incoordenação motora e respiração bifásica abdominal.
 396 Inicialmente, utilizou-se a dose de 50.000UI, a qual teve resultado positivo na
 397 recuperação de bovinos que adoeceram durante o surto ocorrido anteriormente
 398 (GUIZELINI et al. 2019). Nos casos de não recuperação dos ovinos, os
 399 tratamentos foram repetidos utilizando doses maiores.

400 Animais que morreram ou foram eutanasiados *in extremis* foram
 401 necropsiados e fragmentos dos órgãos foram coletados com a mesma
 402 finalidade do experimento 1.

403 O experimento foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso
 404 de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS),
 405 protocolo número 910/2017.

406

407 5 RESULTADOS

408 No primeiro experimento foram fornecidos um total de 9,6 quilogramas
 409 de milho re-hidratado aos 18 animais durante o período de 35 dias. Os ovinos
 410 não apresentaram sinais clínicos em nenhum dos grupos. Por isso, não foi
 411 realizado o teste de comparação estatística.

412 No segundo experimento, os quatro ovinos apresentaram sinais clínicos
 413 de botulismo, sendo três com evolução fatal. Todos receberam o total de 600ml
 414 de sobrenadante contendo toxina botulínica. Os sinais clínicos se iniciaram seis
 415 dias após o início da administração nos ovinos 01 e 03, sete dias no ovino 02 e
 416 oito dias no ovino 04.

417 O ovino 01 apresentou, inicialmente, dificuldade locomotora com
 418 incoordenação e relutância em se movimentar, incontinência urinária grave,
 419 arqueamento do dorso e salivação intensa. Após 10 horas, evoluiu para
 420 decúbito esternal permanente, prostração, respiração abdominal bifásica e
 421 dificuldade em manter a posição normal da cabeça, permanecendo com o

mento apoiado ao solo e ao flanco. Este ovino foi eutanasiado *in extremis* 24 horas após o início dos sinais clínicos. O ovino 02 apresentou regurgitação e refluxo intensos, arqueamento do dorso, incontinência urinária, salivação e dificuldade em se levantar, com evolução para decúbito esternal, respiração abdominal bifásica e apatia. O mesmo foi eutanasiado *in extremis* 24 horas após o início da manifestação clínica. O ovino 03 apresentou tosse e regurgitação, com evolução para decúbito esternal permanente e salivação. Morreu após 26 horas do início do quadro clínico. O ovino 04 apresentou incoordenação dos movimentos, incontinência urinária leve, e permanecia a maior parte do tempo em decúbito esternal, com respiração abdominal bifásica, recuperando-se após o tratamento.

Tratamento foi realizado em todos os animais, no momento em que apresentaram decúbito, utilizando-se soro antibotulínico, por via intramuscular. O ovino 01 recebeu 120.000UI de soro antibotulínico divididas em quatro administrações; o ovino 02, 100.000UI divididas em duas administrações; ovinos 03 e 04 receberam doses únicas de 50.000UI e 100.000UI, respectivamente. O ovino 04 recuperou-se após quatro horas do tratamento, com regressão completa dos sinais. Em nenhum dos animais necropsiados havia lesões macroscópicas e microscópicas e não houve detecção das toxinas em nenhum dos materiais encaminhados para a prova biológica e técnica de soroneutralização.

6 DISCUSSÃO

O primeiro modelo experimental não foi eficiente para reproduzir o botulismo em condições semelhantes aos surtos espontâneos. Após a ocorrência do surto no confinamento, o milho contaminado foi coletado e armazenado em saco plásticos, e fornecido aos animais do experimento aproximadamente quatro meses após o surto. Este mesmo milho havia sido utilizado para reproduzir a doença em um ovino logo após a ocorrência do surto (GUIZELINI et al. 2018). Apesar dos esporos produzidos por *C. botulinum* serem altamente resistentes à luz ultravioleta, desinfetantes e álcoois (MEGID et al., 2016), sua toxina é facilmente destruída pela ação da luz solar, variação

454 brusca da temperatura e dessecação; além disso, quantidades mínimas de
455 oxigênio podem inibir seu desenvolvimento (DUTRA, 1994; KRIEK e
456 ODENDAAL, 2004). Provavelmente, o tempo e o modo de armazenamento do
457 milho não foram adequados para manter as toxinas viáveis para a reprodução
458 experimental proposta neste trabalho, pois os ovinos que receberam o milho na
459 mesma época da ocorrência do surto apresentaram sinais clínicos
460 característicos de botulismo. Além disso, é importante ressaltar que, a
461 distribuição das toxinas na silagem de milho pode não ser homogênea e que as
462 partes coletadas poderiam conter pouca ou nenhuma toxina para induzir a
463 doença.

464 O segundo modelo experimental foi eficiente para reproduzir a doença
465 em condições semelhantes aos surtos espontâneos em que há ingestão de
466 altas doses de toxina botulínica (DUTRA et al., 2001; MYLLYKOSKI et al.,
467 2008; SALVARANI et al., 2017). Entretanto, mesmo os dois ovinos que haviam
468 sido vacinados de acordo com o protocolo recomendado (ovinos 02 e 04)
469 adoeceram, embora os sinais clínicos tenham iniciado posteriormente ao início
470 naqueles animais não vacinados (ovinos 01 e 03). Isso demonstra que, mesmo
471 animais vacinados, podem adoecer caso a quantidade de toxina ingerida seja
472 muito alta, visto que há efeito acumulativo e a toxina não é considerada um
473 bom imunógeno (KRIEK e ODENDAAL, 2004; RIET-CORREA e FERNANDES,
474 2007).

475 Em relação ao tratamento, não existem relatos detalhados sobre a dose
476 ideal de soro a ser empregada, porém sabe-se que o mesmo pode não resultar
477 na recuperação dos animais, principalmente aqueles cujo quadro clínico é
478 avançado (KRIEK e ODENDAAL, 2004; LE MARÉCHAL 2019). Isso ocorre
479 porque, após a ingestão de grande quantidade de toxina, como observado
480 neste experimento, ocorre rápida ligação às junções neuromusculares,
481 tornando-se indisponível a inativação pela antitoxina, não sendo possível
482 realizar a reversão dos quadros clínicos (BARROS et al., 2006). Apesar de
483 todos os animais do experimento terem recebido tratamento em doses
484 diferentes e no início dos sinais clínicos, apenas o ovino 04 recuperou-se. Isso
485 pode ser relacionado ao fato de que este animal era vacinado, o que

possivelmente interferiu no maior intervalo de tempo até o início dos sinais clínicos, e também ao fato de que o tratamento com antitoxina foi feito em dose única de 100.000 UI. O outro ovino vacinado (02), foi tratado com duas doses de 50.000 UI e morreu após 26 horas do início dos sinais clínicos.

Apesar das toxinas botulínicas não terem sido detectadas nas provas biológicas e de soroneutralização, o diagnóstico de botulismo foi confirmado mediante os sinais clínicos, ausência de lesões macroscópicas e microscópicas, pela administração de materiais contaminados provenientes de animais que morreram pela doença anteriormente em um confinamento, e pela recuperação do ovino 04 após o tratamento com soro antibotulínico. Ainda que sejam consideradas provas padrão-ouro no diagnóstico de botulismo, sabe-se que estas possuem baixa sensibilidade devido a vários fatores, como a maior resistência dos camundongos à toxina botulínica e pela rápida ligação da mesma às junções neuromusculares, o que torna a sua disponibilidade sérica muito baixa em pouco tempo, dificultando a sua detecção (DUTRA, 2001; LE MARÉCHAL et al., 2016; CONSTABLE et al., 2017).

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados a reprodução experimental foi eficaz somente no segundo modelo. Nas situações observadas em ambos os modelos experimentais, com ingestão de grandes quantidades da toxina, são necessárias, para o tratamento dos doentes, doses mais elevadas de soro que as preconizadas pelo fabricante e, ainda assim, as mortes podem ocorrer. Conclui-se ainda, que vacinação dos animais nem sempre levará a uma imunização eficiente dos animais quando os mesmos forem expostos a altos níveis de toxina. A principal desvantagem deste modelo é que o mesmo não permite estimar a quantidade de toxina ingerida pelos animais.

8 IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO

O trabalho trata-se de pesquisa aplicada e fundamentada no diagnóstico de uma importante causa de mortalidade em bovinos confinados e também de seus diagnósticos diferenciais. Os resultados terão impactos tecnológicos que consistem na elaboração de protocolos sanitários que minimizem essas perdas e consequentemente impacto econômico resultante na tentativa de evitar a morte dos animais.

Em relação ao impacto social, a redução de perdas por doenças é um fator importante para viabilizar economicamente os confinamentos, os quais se constituem em importante fonte de emprego e renda na atividade pecuária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, M.J.; MALOY, S.E.; MATSON, R.R. Inactivation of Clostridium botulinum toxin by ruminal microbes from cattle and sheep. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, p. 685-688, 1976.

ANNIBALLI, F.; FIORE, A.; LÖFSTRÖM, C.; SKARIN, H.; AURICCHIO, B.; WOULDSTRA, C.; BANO, L.; SEGERMAN, B.; KOENE, M.; BÅVERUD, V.; HANSEN, T.; FACH, P.; ÅBERG, A.T.; HEDELAND, M.; ENGVALL, E.O.; MEDICI, D.D. Management of Animal Botulism Outbreaks: From Clinical Suspicion to Practical Countermeasures to Prevent or Minimize Outbreaks. **Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science**, v. 11, n. 1, p. 191-199, 2013.

BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; LEMOS, R.A.A. Doenças Causadas por Bactérias e Protozoário. In: Ibid (Ed.). **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. São Paulo, Brasil: Agnes Gráfica e Editora. p. 57-62, 2006.

BRAGA, J.F.V.; SOUZA, F.A.L.; FRANKLIN, F.L.A.A.; BESERRA, E.E.A.; BARRETO, F.M.; ARAÚJO-NETO, J.C.; COSTA, F.A.L.; SILVA, S.M.M.S. Surto de raiva em bovinos no estado do Piauí, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 176-179, 2013.

BRAUN, U.; FEIGE, K.; SCHWEIZER, G.; POSPISCHIL, A. Clinical findings and treatment of 30 cattle with botulism. **The Veterinary Record**, v. 156, p. 438-441, 2005.

CÂMARA, A.C.L.; OLIVEIRA, C.M.M.; VALE, A.M.; BATISTA, J.S.; SOTO-BLANCO, B. Epidemiologia, sinais clínicos, achados laboratoriais e patológicos em oito surtos de botulismo em bovinos no Rio Grande do Norte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2014.

CAMERON, C.M. A brief history of botulism in South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 76, n. 1, p. 11-12, 2009.

- 556 CARVALHO, A.Q.; CARVALHO, N.M.; VIEIRA, G.P.; SANTOS, A.C.; FRANCO,
557 G.L.; POTT, A.; BARROS, C.S.L.; LEMOS, R.A.A. Intoxicação espontânea por
558 *Senna obtusifolia* em bovinos no Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Pesquisa**
559 **Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 147-152, 2014.
- 560 CASTRO, M.B.; MOSCARDINI, A.R.C.; REIS JUNIOR, J.L.; NOVAES, E.P.F.;
561 BORGES, J.R.J. Intoxicação aguda por diazinon em bovinos. **Ciência Rural**, v.
562 37, n. 5, p. 1498-1501, 2007.
- 563 CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **PIB do**
564 **agronegócio brasileiro**. Universidade de São Paulo, 2020.
- 565 CONSTABLE, P.D.; HINCHCLIFF, K.W.; DONE, S.H.; GRÜNBERG, W.
566 Botulism. In: Ibid (Eds). **Veterinary Medicine a Textbook of the Diseases of**
567 **Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats**. Philadelphia, United States of
568 America: Elsevier, p. 1363-1367, 2017.
- 569 COSTA, G.M.; SALVADOR, S.C.; PEREIRA, M.N. Botulismo em bovinos
570 leiteiros no Sul de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2068-
571 2071, 2008.
- 572 CURSI, V.C.M.; ZOCOLLER-SENO, M.C.; NOGUEIRA, A.H.C.; ARAUJO, R.F.;
573 CARDOSO, T.C.; DUTRA, I.S. Resposta humoral de bovinos vacinados contra
574 as toxinas botulínicas tipos C e D em diferentes faixas etárias. **Arquivo**
575 **Instituto Biológico**, v. 80, n. 1, p. 99-102, 2013.
- 576 DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; DUTRA, I.S.
577 Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**,
578 v. 99, n. 5, p. 188-190, 1992.
- 579 DUCHEN, L.W. Motor Nerve Growth Induced by Botulinum
580 Toxin as a Regenerative Phenomenon. **Proceedings of the Royal Society of**
581 **Medicine**, v. 65, p. 10-11, 1972
- 582 DUTRA, I.S. **Botulismo em bovinos: um importante problema de saúde**
583 **animal**. Departamento Técnico Rhodia-Mérieux, 1994, n. 1, p. 1-5. (Periódico
584 Técnico).
- 585 DUTRA, I.S. **Epidemiologia, quadro clínico e diagnóstico pela**
586 **soroneutralização em camundongos do botulismo em bovinos no Brasil,**
587 **1989-2001**. 2001. 133p. (Tese de Livre-Docência) - Curso de Medicina
588 Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.
- 589 DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; ROSA I.V.; SOUZA, L.A.A.; NONATO M.
590 Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água
591 contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 43-48, 2001
- 592 DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; SOUZA, A.M. Botulismo em bovinos de corte e
593 leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25,
594 n. 2, p. 115-119, 2005.
- 595 ESTIMA-SILVA, P.; OLIVEIRA, P.A.; BRUHN, F.R.P.; SCHEID, H.V.;
596 MARQUES, L.S.; RIBEIRO, L.S.; SCHILD A.L. Causes of death of beef cattle
597 raised in feedlots. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 5, p. 333-339,
598 2020.

- 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**, v. 12, p. 204-209, 2000.
- GASPAR, E.B.; MINHO, A.P.; SANTOS, L.R. **Manual de boas práticas de vacinação e imunização de bovinos**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2015. 10p.
- GUIZELINI, C.C.; LEMOS, R.A.A.; PAULA, J.P.L.; PUPIN, R.C.; GOMES, D.C.; BARROS, C.S.L.; NEVES, D.A.; ALCÂNTARA, L.O.B.; SILVA, R.O.S.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS T.B. Type C botulism outbreak in feedlot cattle fed contaminated corn silage. **Anaerobe**, v. 55, p. 103-106, 2018.
- HEIDER, L.C.; MCCLURE, J.T.; LEGER, E.R. Presumptive diagnosis of *Clostridium botulinum* type D intoxication in a herd of feedlot cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, n. 3, p. 2010-2012, 2001.
- HOGG, R.; LIVESEY, C.; PAYNE, J. Diagnosis and implications of botulism. **In practice**, v. 30, p. 392-397, 2008.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Banco de Tabelas Estatísticas. 2018. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/home/pmc/brasil>. Acesso em 19 de janeiro de 2020.
- KELCH, W.J.; KERR, L.A.; PRINGLE, J.K.; ROHRBACH, B.W.; WHITLOCK, R.H. Fatal *Clostridium botulinum* toxicosis in eleven Holstein cattle fed round bale barley haylage. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**, v. 12, n. 5, p. 453-455, 2000.
- KRIEK, N.P.J.; ODENDAAL, M.W. Botulism. In: Coetzer, J.A.W.; Thomson, G.R.; Tustin, R.C. **Infectious Diseases of Livestock**, Cape Town, Africa: Oxford Press, p. 1885-1899, 2004.
- LE MARÉCHAL, C.L.; HULIN, O.; MACÉ, S.; CHUZEVILLE, C.; ROUXEL, S.; POËZEVARA, T. MAZUET, C.; POZET, F.; SELLAL, E.; MARTIN, L.; VIRY, A.; RUBBENS, C.; CHEMALY, M. A Case Report of a Botulism Outbreak in Beef Cattle Due to the Contamination of Wheat by a Roaming Cat Carcass: From the Suspicion to the Management of the Outbreak. **Animals**, v. 9, p. 1025-1041, 2019.
- LE MARÉCHAL, C.L.; WOULDSTRA, C.; FACH, P. Botulism. In: UZAL, F.A.; SONGER, G.; PRESCOTT, J.F.; POPOFF, M.R. **Clostridial Diseases of Animals**. Iowa, USA: Wiley Blackwell, p. 303-330, 2016.
- LEMOS, R.A.A. **Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil**. 2005. 149p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus e Jaboticabal.
- LINDSTRÖM, M.; KORKEALA, H. Laboratory diagnostics of botulism. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 298-314, 2006.

- 640 LINDSTRÖM, M.; MYLLYKOSKY, J.; SIVELÄ, S; KORKEALA, H. *Clostridium*
641 *botulinum* in cattle and dairy products. **Critical Reviews in Food Science and**
642 **Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 281-304, 2010.
- 643 LOBATO, C.F.; SALVARANI, F.M.; ASSIS R.A. Clostridioses dos pequenos
644 ruminantes. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 561-
645 562, p. 23-34, 2007.
- 646 LOBATO, C.F.; SALVARANI, F.M.; SILVA, R.O.S.; SOUZA, A.M.; LIMA,
647 C.G.R.D.; PIRES, P.S.; ASSIS, R.A.; AZEVEDO, E.O. Botulismo em
648 ruminantes causado pela ingestão de cama-de-frango. **Ciência Rural**, v. 38, n.
649 4, p. 1176-1178, 2008.
- 650 LORETTI, A.P.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; CORRÊA, A.M.; BANGEL,
651 J.J.; FERREIRO, L. Neurological disorder in dairy cattle associated with
652 consumption of beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus*. **Journal**
653 **of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 2, p. 123-132, 2003.
- 654 LUCENA, R.B.; PIEREZAN, F.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; FIGHERA,
655 R.A.; BARROS, C.S.L. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos.
656 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 428-434, 2010.
- 657 MABONI, F.; MONEGO, F.; DUTRA, I.; COSTA, M.M.; VARGAS, A.C.
658 Ocorrência de botulismo em bovinos confinados no Rio Grande do Sul. **Ciência**
659 **Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 962-965, 2010.
- 660 MALAFAIA, P.; GRANATO, T.A.L.; COSTA, R.M.; SOUZA, V.C.; COSTA,
661 D.F.A.; TOKARNIA, C.H. Major health problems and their economic impact on
662 beef cattle under two different feedlot systems in Brazil. **Pesquisa Veterinária**
663 **Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 837-843, 2016.
- 664 MARTIN, S. *Clostridium botulinum* type D intoxication in a dairy herd in Ontario.
665 **Canadian Veterinary Journal**, v. 44, p. 493-495, 2003.
- 666 MARTINS, R.A. **Estudo da morbidade e mortalidade em confinamentos de**
667 **bovinos para terminação e seus impactos econômicos**. 2016. 92p.
668 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Medicina Veterinária,
669 Universidade Federal de Minas Gerais.
- 670 MEGID, J. Botulismo. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças**
671 **infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro,
672 Brasil: Editora Guanabara Koogan, p. 9-20, 2016.
- 673 MENEGUCCI, E.A.; DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J. Sensibilidade toxicológica
674 e especificidade do teste de microfixação de complemento na detecção de
675 toxinas botulínicas C e D em meio de cultura e fígado de camundongos.
676 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 47-52, 1998.
- 677 MYLLYKOSKI, J.; LINDSTRÖM, M.; KETO-TIMONEN, R.; SÖDERHOLM, H.;
678 JAKALA, J.; KALLIO, H.; SUKURA, A.; KORKEALA, H. Type C bovine botulism
679 outbreak due to carcass contaminated non-acidified silage. **Epidemiology and**
680 **Infection**, v. 137, p. 284-293, 2008.
- 681 NAKAMURA, K.; KOHDA, T.; UMEDA, K.; YAMAMOTO, H.; MUKAMOTO, M.;
682 KOZAKI, S. Characterization of the D/C mosaic neurotoxina produced by

- 683 *Clostridium botulinum* associated with bovine botulismo in Japan. **Veterinary**
684 **Microbiology**, v. 140, p. 147-154, 2010.
- 685 NOBRE, C.M.; SILVA, T.I.B.; COSTA, G.C.; SILVA, A.R.; SOUZA, R.G.;
686 MONTOZO, M.F.G. Botulism in Cattle Associated with Osteophagy in the State
687 of Acre, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, p. 1-5, 2019.
- 688 NOGUEIRA, V.A.; FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P.V. Intoxicação por antibióticos
689 ionóforos em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 191-197,
690 2009
- 691 NUM, S.M.; USEH, N.M. Botulism in man and animals. **Bulgarian Journal**
692 **Veterinary Medicine**, v. 17, n. 4, p. 241-266, 2014.
- 693 OLIVEIRA, T.S.; BULL, V.; REZENDE, C.A.; FURTINI, R.; COSTA, E.A.;
694 PAIXÃO, T.A.; Santos, R.L. Perfil das amostras do sistema nervoso central de
695 bovinos com síndrome neurológica e diagnóstico da raiva bovina no serviço de
696 defesa sanitária de Minas Gerais, 2003-2010. **Pesquisa Veterinária**
697 **Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 333-339, 2012
- 698 PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Importância
699 econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil.
700 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 752-758, 2013.
- 701 PUPIN, R.C.; LEAL, P.V.; PAULA, J.P.L.; GUIZELINI, C.C.; MÖCK, T.B.M.;
702 LEMOS, R.A.A.; GOMES, D.C. Cattle diseases in Mato Grosso do Sul, Brazil: a
703 24-year survey (1995-2018). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 9, p.
704 686-695, 2019.
- 705 RADOSTITS, O.M. **Herd Health: Food Animal Production Medicine**. 3. ed.
706 Philadelphia: Ed. Saunders, 456-568p, 2001.
- 707 RASETTI-ESCARGUEIL, C.; LEMICHEZ, E.; POPOFF, M.R. Public Health Risk
708 Associated with Botulism as Foodborne Zoonoses. **Toxins**, v. 12, p. 17-41,
709 2020.
- 710 REZENDE, A.L.; BAPTISTA, A.L.; FONSECA, P.A.; MOURA, R.L.; JUSTO,
711 F.B.; NOGUEIRA, G.M.; SAUT, P.E. Prevalência de doenças em bovinos
712 confinados no município de Paracatu, Minas Gerais. **Veterinária Notícias**, v.
713 20, n. 1, p. 51, 2014.
- 714 RIBAS, N.L.K.S.; CARVALHO, R.I.; SANTOS, A.C.; VALENÇOELA, R.A.;
715 GOUVEIA, A.F.; CASTRO, M.B.; MORI, A.E.; LEMOS, R.A.A. Doenças do
716 sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. **Pesquisa**
717 **Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 10, p.1183-1194, 2013.
- 718 RIET-CORREA, F.; FERNANDES, C.G. Botulismo. In: RIET-CORREA, F.;
719 SCHILD, A. L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. **Doenças de Ruminantes e**
720 **Equídeos**. Santa Maria: Pallotti, v. 1. p. 215-224, 2007.
- 721 RISSI, D.R.; KOMMERS, G.D.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SCHILD, A.L.;
722 BARROS, C.S.L. Meningoencefalite por *Listeria monocytogenes* em ovinos.
723 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 51-57, 2010.
- 724 RONDELLI, L.A.S.; SILVA, G.S.; BEZERRA, K.S.; RONDELLI, A.L.H.; LIMA,
725 S.R.; FURLAN, F.H.; PESCADOR, C.A.; COLODEL, E.M. Doenças de bovinos

- em Mato Grosso diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da UFMT (2005-2014). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 432-440, 2017.
- SALVARANI, F.M.; OTAKA, D.Y.; OLIVEIRA, C.M.C.; REIS, A.S.B.; PERDIGÃO, H.H.; SOUZA, A.E.C.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D. Type C waterborne botulism outbreaks in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Amazon region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 697-700, 2017.
- SANTOS, B.L.; LADEIRA, S.R.L.; RIET-CORREA, F.; SOARES, M.P.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E.S.; RAFFI, M.B.; SCHILD, A.L. Clostridial diseases diagnosed in cattle from the South of Rio Grande do Sul, Brazil. A forty-year survey (1978-2018) and a brief review of the literature. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 435-446, 2019.
- SANT'ANA, F.J.F.; BARROS, C. S. L. Polioencephalomalacia in ruminants in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 3, n. 1, p. 70-79, 2010.
- SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. **Pesquisa de Clostridium botulinum e teste de inoculação em produtos cárneos embalados a vácuo**. 1980. 127f. (Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SENTURK, S.; CIHAN, H. Outbreak of botulism in a dairy herd in Turkey. **Irish Veterinary Journal**, v. 60, n. 8, p. 481-484, 2007.
- SILVA, R.O.S.; JUNIOR, C.A.O.; GONÇALVES, L.A.; LOBATO, F.C.F. Botulism in ruminants in Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 8, p. 1411-1417, 2016.
- SIMPSON, L.L. The Origin, Structure, and Pharmacological Activity of Botulinum Toxin. **Pharmacological Reviews**, v. 33 n. 3, p. 155-188, 1981.
- SOARES, M.C.; GASPAR, A.O.; BRUMATTI, R.C.; GOMES, D.C.; NEVES, D.A.; ALCÂNTARA, L.O.B.; LEAL, P.V.; LEMOS, R.A.A. Economic impact of an outbreak of botulismo in a cattle feedlot. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1365-1370, 2018.
- TAVELLA, A.; MOROSETTI, G.; CARESIA, S.; CIAVATTA, P.; TREVISIOL, K.; ARMANI, M.C.; STIFTER, E.; PIFFER, C.; BANO, L.; LOMBARDO, D. Acute Type C botulism with fatal consequences in a Holstein Breeding establishment in Northern Italy. **Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v. 5, n. 1, p. 502-506, 2014.
- THEILER, A.; VILJOEN, P.R.; GREEN, H.H.; DU TOIT, P.J.; MEIER, H.; ROBINSON, E.M. Lamsiekte (parabotulism) in cattle in South Africa. **Rep. Dir. vet. Educ. Res.**, v. 11/12, p. 821-1361, 1927.
- TOKARNIA C.H., LANGENEGGER J., LANGENEGGER C.H., CARVALHO E.V. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 465-472, 1970.
- USDA – United State Department of Agriculture**. Livestock and poultry: world markets and trade. 2019. Disponível em <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda->

768 esmis/files/73666448x/g445ct12h/ff365k146/Livestock_poultry.pdf. Acesso em
769 19 de janeiro de 2020.

770 VAN DER BURGT, G.M.; MITCHELL, E.S.E.; OTTER, A.; WHITAKER, K.A.;
771 HOGG, R. Seven outbreaks of suspected botulism in sheep in the UK. **The**
772 **Veterinary Record**, v. 161, p. 28-30, 2007.

773 **WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION**. 2002. *Clostridium botulinum*:
774 international Programme on Chemical Safety. Poisons Information Monograph
775 858 Bacteria. Disponível em:
776 <http://www.who.int/csr/delibepidemics/clostridiumbotulism.pdf>. Acesso em: 19
777 de janeiro de 2020.

CAPÍTULO 2

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA *Anaerobe* com o título “Surto de botulismo tipo c em bovinos confinados alimentados com silagem de milho contaminada”

Type C botulism outbreak in feedlot cattle fed contaminated corn Silage

Carolina C. Guizelini^a, Ricardo A.A. Lemos^a, Juliana L.P. de Paula^a,
Rayane C. Pupin^a, Danilo C. Gomes^a, Claudio S.L. Barros^a, *, Danielle A.
Neves^b, Lilian O.B. Alcântara^b, Rodrigo O.S. Silva^c, Francisco C.F. Lobato^c,
Tessie B. Martins^a

ABSTRACT

A large outbreak of botulism in feedlot steers fed corn silage contaminated with *Clostridium botulinum* neurotoxin type C (BoNT/C) is reported occurring in Midwestern Brazil in August 2017. The onset of the outbreak occurred 15 days after 1700 steers started to be fed the contaminated corn silage. Affected steers were alert and afebrile with varying degrees of flaccid paralysis in various muscle groups. A total of 1100 steers were affected, 1090 of which died within four days. Ten steers recovered after treatment with antitoxin. No gross or microscopic lesions were found in affected steers. The diagnosis was based on epidemiological data, characteristic clinical signs, and positive mouse bioassay results. This outbreak is interesting due to the high number of fatally affected cattle and the on-site diagnostic approach. This case report demonstrates the difficulties in diagnosing and treating botulism in cattle.

Animal botulism commonly occurs due to the ingestion of botulinum neurotoxins (BoNTs) produced by *Clostridium botulinum*, the spores of which are found in soil and water as well as in the digestive tracts of different animal species [1]. *C. botulinum* grows in anaerobic environments, such as in carrion, at the bottom of standing water or in deteriorated food. BoNTs exert their effects at neuromuscular junctions by inhibiting the exocytosis of acetylcholine and compromising the stimulus for muscle contraction, thus resulting in flaccid paralysis, which is a hallmark of this usually fatal disease [2]. No gross or histopathological findings are associated with botulism [3].

Seven potent antigenically distinguishable BoNTs, identified by the letters A-G, have been identified [4,5]. Botulism is endemic in ruminants in Brazil and BoNTs C and D are the types most commonly involved [3,6]. Recently, botulism has also emerged as an important disease in domestic animals in Europe [7]. Here, we describe a massive outbreak of botulism in feedlot steers fed corn silage containing BoNT type C (BoNT/C) and the successful treatment of affected cattle with a commercial antitoxin.

On the afternoon/evening of August 2nd, 2017, approximately 30 steers developed a slow pace and were reluctant to move. Approximately 12 hours later, roughly 700 affected or dead bovine were observed, and clinical examinations and necropsies were performed. The steers remained bright and alert throughout the clinical course, which was peracute to acute. The first signs that were observed were muscle weakness in the forelimbs and mild difficulty in breathing, primarily during inspiration. The course rapidly progressed to sternal recumbency, a mild decrease in cutaneous sensation and hypotonicity or flaccid paralysis of the tongue, tail, forelimbs, and hindlimbs. At this point, abdominal biphasic breathing was evident. Some steers that could keep their head up made repeated but unsuccessful attempts to get up (Fig. 1). Others rapidly reached a position in which the neck was extended with the head resting on the ground and the tongue protruding from the mouth (Fig. 2). Finally, they presented in lateral recumbency, with sialorrhea and died. During the first two days, 1035 (95%) steers spontaneously died or were euthanized. An additional 4% (55) died on the third and fourth days. Deaths occurred homogeneously in the ten pens, indicating a common source for the insult. The signs described above are the typical signs of botulism in cattle [8].



838 **Fig. 1.** Outbreak of botulism in feedlot cattle. Flaccid paralysis. The lack of tonus in the limbs
839 prevents the steer from standing.



840 **Fig 2.** Outbreak of botulism in feedlot cattle. Flaccid paralysis causes the tongue to protrude
841 from the mouth.
842

843 The steers of the present report had been fed five times per day with a
844 daily-prepared ration consisting of silage of corn (46.3%), guinea grass (39.8%),
845 hulls of soybean grain (5.2%), cotton seeds (5.1%), soybean bran (1.6%), a mix
846 of macro minerals, trace minerals and vitamins (1.1%), urea (0.7%) and
847 limestone (0.2%). The ration was mixed and distributed at the troughs by proper
848 equipment.

849 Briefly, the corn for the silage was bought from neighboring farms with
850 14% humidity and ship to the farm of the outbreak by trucks. Then it was
851 hydrated to 32% and built-in bags 60x9 feet long with a capacity of 130e150
852 tons of corn. The corn bag silo was opened and used as needed. In June 30th,
853 the 1700 steers were brought to the feedlot and distributed in groups of 170 in
854 10 contiguous lots. Water was available to the animals ad libitum at
855 independent troughs in each lot.

856 The steers were fed dry corn for 15 days and an entire bag of corn silage
857 that appeared normal for 20 days. The bag used at the time of the outbreak was
858 opened after that, and since that time, for 15 days, it had been fed to the cattle.
859 The silage had formed large (30e50 cm) lumps of conglutinated corn, which
860 was reported as unusual. Its use as part of the ration was ceased the moment it
861 was recognized that the animals were sick. Deaths started at the tenth lot, but
862 occurred homogeneously in the ten pens. Sheep and dairy cattle on the same
863 property that were fed the same ration without the corn grain were unaffected.
864 There were no reports of similar disease occurring in other farms in the region.

865 During the first two days of the outbreak, 1035 (95%) cattle
866 spontaneously died or were euthanized. An additional 55 (4%) cattle died on the
867 third and fourth days. No similar disease has before occurred in this farm.

868 A presumptive diagnosis of botulism was made, and ten steers were
869 treated with 50,000 e 100,000 IU of antitoxin to types C and D (Botulin C-D,
870 Vencofarma, Brazil) as soon as they became recumbent. Three to 26 days after
871 treatment, these steers were able to stand without help and eventually
872 recovered fully. All untreated cattle and two other recumbent steers that
873 received only 20,000 IU of the antitoxin died.

874 Three samples of approximately 500 g of ration from the troughs of three
875 different pens and portions of each of its components were submitted for toxin
876 detection and identification by toxin neutralization tests in mice (mouse
877 bioassay) [9]. *C. botulinum* BoTN/C was detected in one of the three samples of
878 the corn silage.

879 For diagnostic purposes, one sheep that was not involved in the outbreak
880 was fed the suspect corn silage and developed clinical signs of botulism within
881 12 days. This sheep recovered after treatment with 50,000 IU of the same
882 commercial antitoxin used to treat the cattle. These procedures were approved
883 by the Ethical Committee of the UFMS according to the National Council for the
884 Control of Animal Experimentation (CEUA 910/2017).

885 During the outbreak, 20 affected steers were euthanized and immediately
886 necropsied. Samples obtained from several organs were processed for routine
887 histopathology. Samples of the liver (500 g), and contents from the small
888 intestine (200 ml) and rumen (500g ml) were collected from all 20 necropsied
889 steers, totaling 60 analyzed samples. Serum samples from ten live steers were
890 used for the titration of neutralizing antibodies against BoNT/C as previously
891 described [10]. Five of these live steers exhibited acute clinical signs of botulism
892 at the time of blood sampling and eventually died, three presented acute signs
893 after blood sampling and died, and two remained unaffected.

894 Neither gross nor histopathological changes were observed in any
895 necropsied animal. The mouse bioassay identified BoNT/C in the liver of one
896 steer and the ruminal and intestinal contents of another (3/6 samples), and yet it
897 was negative in the liver, small intestine and rumen contents (54 samples) from
898 another 18 affected steers. It is not uncommon to have only a small proportion
899 or even none of the clinically affected cattle testing positive in the mouse
900 bioassay during botulism outbreaks [8]. This is probably due to the high
901 sensitivity of cattle to BoNT. It is reported that 1 g of BoNT dispersed in food
902 can kill 400,000 adult cows [11]. In ruminants, small amounts of toxin rapidly
903 bind to neuromuscular junctions and cause clinical signs, leaving low amounts
904 of or no free BoNT in the blood [8]. Additionally, the period of time during which
905 BoNT is detectable in the blood before it is internalized at neuronal junctions is

actually quite short [11]. Interestingly, the two steers that tested positive in this outbreak and one additional steer that tested negative were sampled 24 hours after they began to show clinical signs, while the remaining 17 steers were sampled 48 hours after the onset of clinical signs. This finding reinforces that to increase the negative predictive value following a diagnosis of botulism in an outbreak, it is important to rapidly collect multiple samples when clinical signs first begin to appear [6].

The mouse bioassay is still considered the gold standard test for the diagnosis of botulism, although it is known to have a very low sensitivity [1]. In this report, three out of sixty tested samples (5%) were positive in the mouse bioassay. Similar results are reported elsewhere [12,13] and highlight the need for the development of alternative methods for the diagnosis of animal botulism.

Nine of the ten serum samples obtained from live steers had no neutralizing antibody titer against BoNT/C. One animal, which was not clinically affected, had a neutralizing antibody titer of 4 UI/mL for BoNT/C. These low titers were probably because a booster dose was not administered 30 days after the prime vaccination, which can be considered an improper vaccination protocol [14]. A low quality of the vaccine used is unlikely; all commercial botulism vaccines in Brazil are systematically tested by the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply prior to commercialization, and each batch should induce at least 5 IU/mL in the potency test [15]. In Brazil, systematic vaccination against botulism is recommended and usually performed, but it is not mandatory.

In the current outbreak, a presumptive diagnosis of botulism was made based on epidemiological data, clinical signs, and the absence of both gross and microscopic tissue lesions. The diagnosis of botulism was confirmed by the detection of BoNT/C in the corn silage (the source of intoxication) and in the liver and gastrointestinal contents of affected steers.

We were unable to determine the source of BoNT that contaminated the corn fed to the steers in this outbreak. Silage contaminated by carcasses of small animals such as rodents and cats [11] has been described as a source of intoxication. *C. botulinum* is able to use plant material as a substrate for its

growth [16] and a high prevalence of *C. botulinum* spores occurs in sediments and in the intestinal contents of animals [16], which may occasionally contaminate feedstuffs included in the silage, which will serve as a vehicle for BoNT and consequently cause outbreaks of botulism with high mortality [11,17].

The acidification of silage to a pH of 3.8-4.0 inhibits the growth of *C. botulinum*, even under anaerobic conditions [18]. In the present outbreak, the pH measured in one sample of the silage was 7.4, well above the range reported inhibiting the growth of *C. botulinum* [18]. Furthermore, the corn presented moldy grains, indicating inadequate storage, which is conducive to the production of botulinum toxin, even in the absence of animal carcasses [19].

We were unable to perform BoNT subtyping. Subtyping would only be possible using polymerase chain reaction after enrichment of the samples or using Endopep-MS. So far, there are no studies in Brazil subtyping BoNT in livestock outbreaks of botulism, although it would be epidemiologically very interesting to know whether type C or a type C/D was involved in the outbreak.

The disease was also reproduced in a sheep, thus confirming the source of the toxin. Additionally, affected steers, as well as the experimentally infected sheep, recovered fully after treatment with specific antitoxin; this diagnostic procedure can be seen as a therapeutic diagnosis approach.

In the current outbreak, the morbidity rate was 64.7% and the lethality rate was 99.1%. These rates are similar to those reported for other botulism outbreaks [6,20]. High morbidity occurs when a common source of BoNT is available to a large number of cattle [12]. Moreover, the disease incubation period and clinical signs of the steers reported here are similar to those previously described for botulism in cattle [3,12].

Here, cattle were successfully treated for botulism with specific antitoxin. Antitoxins are commonly used to treat botulism in humans but rarely reduce mortality in affected patients [16]. The results obtained in the present work corroborate the findings of recent reports that recommend the use of antitoxin therapy as a practical option for treating other domestic species, including severely affected individuals [10,21].

Important issues had to be dealt with in the aftermath of the outbreak. Contaminated corn silage was placed on deep trenches excavated in empty fields and burnt, after which the trenches were covered with earth. There was no practical way of moving the nonaffected steers from the premises. So they were then vaccinated with one dose of a commercial vaccine against botulism including toxoid types C and D. The equipment was washed clean but not disinfected. The new batch of silage from a different source was fed to the non-affected steers.

The present report documents a massive outbreak of botulism in cattle and the successful treatment of some affected steers. The information gathered here may be helpful for managing botulism in cattle and may especially help those seeking to prevent large outbreaks and diagnose botulism in a timely manner in large populations of confined cattle.

FUNDING

This work was funded by the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/CNPq, Grant 15/2014; PRONEM-MS, Grant 59/300.126/2015; FUNDECT/CAPES, Grant 05/2014; and PVMS, Grant 59/300.032/2015).

DECLARATIONS OF INTEREST

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

REFERENCES

- [1] C. Le Marechal, C. Woudstra, P. Fach, Botulism, in: F. Uzal, J. Prescott, G. Songer, M. Popoff (Eds.), *Clostridial Diseases of Animals*, John Wiley & Sons, Ames, IA, USA, 2016, pp. 303 e 330.
- [2] J. Mayhew, Toxic diseases, in: J. Mayhew (Ed.), *Large Animal Neurology*, Wiley Blackwell, Ames, IA, USA, 2009, pp. 321 e 359.

- 1001 [3] C.S.L. Barros, D. Driemeier, I.S. Dutra, Botulismo, in: Doenças do Sistema
1002 Nervoso de Bovinos no Brasil [Diseases of the Central Nervous System in
1003 Cattle in Brazil], Vallée, Montes Claros, MG, Brazil, 2006, pp. 57 e 62.
- 1004 [4] N. Dover, J.R. Barash, K.K. Hill, G. Xie, S.S. Arnon, Molecular
1005 characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene, *J. Infect. Dis.* 209
1006 (2014) 192 e 202. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit450>.
- 1007 [5] S.E. Maslanka, C. Luquez, J.K. Dykes, W.H. Tepp, C.L. Pier, S. Pellett, B.H.
1008 Raphael, S.R. Kalb, J.R. Barr, A. Rao, E.A. Johnson, A novel botulinum
1009 neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid-like structure with
1010 regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized
1011 with serotype A antitoxin, *J. Infect. Dis.* 213 (2016) 379 e 385.
1012 <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv327>.
- 1013 [6] R.O.S. Silva, C.A. Oliveira Junior, L.A. Gonçalves, F.C.F. Lobato, Botulism
1014 in ruminants in Brazil, *Ciência Rural*. 46 (2016) 1411 e 1417.
1015 <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151486>.
- 1016 [7] H. Skarin, A.T. Aberg, C. Woudstra, T. Hansen, C. Lofstrom, M. Koene, L.
1017 Bano, M. Hedeland, F. Anniballi, D. De Medici, E.O. Engvall, The workshop on
1018 animal botulism in Europe, *Biosecur Bioterror* 11 (2013). S183 e S190,
1019 <https://doi.org/10.1089/bsp.2012.0076>.
- 1020 [8] P.D. Constable, K.W. Hinchcliff, S.H. Done, W. Greenberg, Botulism, in:
1021 *Veterinary Medicine a Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs,*
1022 *and Goats*, Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 2017, pp. 1363 e 1367.
- 1023 [9] M. Sebald, J.C. Petit, *Methodes de Laboratoire Bacteries Anaerobies et Leur*
1024 *Identification*, second ed., Institute Pasteur, Paris, France, 1997.
- 1025 [10] R.O.S. Silva, R.A. Martins, R.A. Assis, C.A. Oliveira, F.C.F. Lobato, Type C
1026 botulismo in domestic chickens, dogs and black-pencilled marmoset (*Callithrix*
1027 *penicillata*) in Minas Gerais, Brazil, *Anaerobe* 51 (2018) 47 e 49.
1028 <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.013>.
- 1029 [11] F.D. Galey, R. Terra, R. Walker, J. Adaska, M.A. Etchebarne, B. Puschner,
1030 E. Fisher, R.H. Whitlock, T. Rocke, D. Willoughby, E. Tor, Type C botulism in
1031 dairy cattle from feed contaminated with a dead cat, *Vet. Diagn. Invest.* 12
1032 (2000) 204 e 209.
- 1033 [12] N.P.J. Kriek, M.W. Odendaal, Botulism, in: *Infectious Diseases of*
1034 *Livestock*, Oxford Press, Cape Town, South Africa, 2004, pp. 1885 e 1902.
- 1035 [13] R.O.S. Silva, S.Y.M. Gomez, L.B. Medeiros, M.V.R. Marques, A.S.G. Silva,
1036 E.N. Mureb, C.A. Oliveira Junior, S.M. Favoretto, F.C.F. Lobato, N.R.S. Martins,
1037 Antitoxin therapy of natural avian botulism outbreaks occurred in Brazil,
1038 *Anaerobe* 48 (2017) 115 e 117. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.08.005>.
- 1039 [14] A. Steinman, M. Chaffer, D. Elad, N.Y. Shpigel, Quantitative analysis of
1040 levels of serum immunoglobulin G against botulinum neurotoxin type D and
1041 association with protection in natural outbreaks of cattle botulism, *Clin. Vaccine*
1042 *Immunol.* 13 (2006) 862 e 868. <https://doi.org/10.1128/CVI.00046-06>.

- 1043 [15] MAPA - Ministério da Agricultura, Instrução Normativa n. IN23 de 2002,
 1044 Diário da União.
 1045 [http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method¼vis](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method¼visualizarAtoPortalMapa&chave¼612413058)
 1046 [ualizarAtoPortalMapa&chave¼612413058](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method¼visualizarAtoPortalMapa&chave¼612413058), 2002. (Accessed 19 June 2018).
- 1047 [16] J. Myllykoski, M. Lindström, R. Keto-Timonen, H. Söderholm, J. Jakala,
 1048 H. Kallio, A. Sukura, H. Korkeala, Type C bovine botulism outbreak due to
 1049 carcass contaminated non-acidified silage, *Epidemiol. Infect.* 137 (2009) 284 e
 1050 293.
- 1051 [17] L.C. Heider, J.T. McClure, E.R. Leger, Presumptive diagnosis of
 1052 *Clostridium botulinum* type D intoxication in a herd of feedlot cattle, *Can. Vet.* 42
 1053 (2001) 210 e 212.
- 1054 [18] W.P. Segner, C.F. Schmidt, J.K. Boltz, Enrichment, isolation, and cultural
 1055 characteristics of marine strains of *Clostridium botulinum* type C, *Appl.*
 1056 *Microbiol.* 22 (1971) 1017 e 1024.
- 1057 [19] G.M. da Costa, S.C. Salvador, M.N. Pereira, Botulismo em bovinos leiteiros
 1058 no Sul de Minas gerais, Brasil, *Ciência, Rural Times* 28 (2008) 2068 e 2071.
- 1059 [20] I.S. Dutra, J. Döbereiner, I.V. Rosa, L.A.A. Souza, M. Nonato, Surtos de
 1060 botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada,
 1061 *Pesqui. Vet. Bras.* 21 (2001) 43 e 48. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2001000200002)
 1062 [736X2001000200002](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2001000200002).
- 1063 [21] A.L. Johnson, S.C. McAdams-Gallagher, H. Aceto, Outcome of adult
 1064 horses with botulism treated at a veterinary hospital: 92 cases (1989-2013), *J.*
 1065 *Vet. Intern. Med.* 29 (2015) 311 e 319. <https://doi.org/10.1111/jvim.12502>.

CAPÍTULO 3

ARTIGO A SER PUBLICADO NA REVISTA *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* com o título “Raiva em bovinos confinados”

Raiva em bovinos confinados

Juliana Paniago Lordello de Paula, Rayane Chitolina Pupin, Marcelo Augusto de Araújo, Thaisa Xavier e Silva, Ricardo Antonio Amaral de Lemos

1 INTRODUÇÃO

O sistema de confinamento de bovinos de corte é uma atividade que possibilita redução na idade de abate dos animais, maior produção por área e aumento da qualidade da carne (PEIXOTO, 2010). No Brasil, em 2019, foram abatidas 6,09 milhões de bovinos oriundos desse sistema de produção, o que equivale a 80% de aumento em relação a 2009 (ABIEC 2020).

Existem poucos estudos sobre causas de mortalidades em bovinos confinados no Brasil, sendo as doenças respiratórias e os transtornos digestórios os principais problemas sanitários nesse sistema de produção (MALAFAIA, et al. 2016; MARTINS, 2016; ESTIMA-SILVA, et al. 2020). Distúrbios neurológicos são menos frequentes: a raiva é descrita de forma esporádica em levantamento sobre causas de mortes em confinamentos de bovinos (ESTIMA-SILVA et al., 2020) e surtos de botulismo com importantes perdas econômicas são relatados (GUIZELINI et al., 2018; SOARES et al., 2018). Em outros países também predominam as doenças respiratórias e digestivas, mas há um maior número de casos de doenças nervosas, principalmente a polioencefalomalacia e a meningoencefalite tromboembólica, quando comparados com o Brasil (CHURCH e RADOSTITIS, 1981; SANT’ANA et al., 2009; CUNHA et al., 2010; NICHOLS et al., 2013).

A raiva é uma doença neurotrópica e invariavelmente fatal causada por um *Lyssavirus* da família Rhabdoviridae, transmitida em bovinos por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (BARROS et al., 2006). É descrita como a principal causa de morte em bovinos no Brasil, nos diferentes estados (GALIZA et al., 2010; LUCENA et al., 2010; RONDELLI et al., 2017; QUEIROZ et al., 2018; TERRA et al., 2018; PUPIN et al., 2019; MOLOSSI et al., 2021), entretanto, apesar de sua importância nos sistemas de criação extensivos (DOGNANI et al., 2016; QUEIROZ et al., 2018; MELLO et al., 2019; PUPIN et al., 2019), apenas uma ocorrência em bovinos confinados é descrita (ESTIMASILVA et al., 2020). Em outros países, em confinamentos, surtos da doença são descritos no México (CASTILLO et al., 2015) e na Argentina (MARGINEDA et al., 2021) e a mesma é considerada rara nos Estados Unidos (GRIFFIN, 1998).

O objetivo do presente trabalho é descrever um surto de raiva em bovinos confinados enfatizando a importância do diagnóstico diferencial e do estabelecimento de protocolos sanitários para prevenção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os dados epidemiológicos e físicos foram colhidos em visitas a propriedade de ocorrência da doença, onde foram realizadas entrevistas com o veterinário responsável pelo rebanho, exames clínicos e coletas de materiais para exames laboratoriais.

Dos oito animais que morreram, quatro bovinos foram necropsiados na propriedade e um encaminhado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMEZ-UFMS). Dois bovinos foram eutanasiados após anestesia geral utilizando tiopental e infusão de cloreto de potássio, e em seguida submetidos à necropsia, na qual fragmentos de órgãos foram coletados, fixados em formol a 10% e processados rotineiramente para histologia. Amostras de encéfalo foram mantidas sob refrigeração e encaminhadas para a Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal do Estado de Mato Grosso do Sul (IAGRO), para

1128 realização dos exames de imunofluorescência direta e inoculação intracerebral
1129 em camundongos para o diagnóstico de raiva.

1130

1131 3 RESULTADOS

1132

1133 Os casos ocorreram em um confinamento no município de Terenos,
1134 Mato Grosso do Sul, com um total de 4300 bovinos, os quais eram adquiridos
1135 de diferentes origens. No dia da recepção, era realizada vacinação contra
1136 botulismo, carbúnculo sintomático, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C.*
1137 *sordelli* e doenças respiratórias, além de desverminação com albendazole
1138 (2ml/20kg).

1139 O surto ocorreu em um lote de 200 animais de 18 meses de idade,
1140 provenientes de uma propriedade, localizada no município de Aquidauana,
1141 Mato Grosso do Sul, região endêmica de raiva, com vacinação obrigatória.
1142 Destes animais, adoeceram seis machos e duas fêmeas mestiças. O
1143 coeficiente de morbidade, se considerados todos os bovinos do confinamento
1144 foi de 0,18%, no entanto, considerando como população sob risco apenas os
1145 animais desse lote, o coeficiente foi de 4%.

1146 Os sinais clínicos observados foram apatia, incoordenação, dismetria,
1147 espasmos musculares, disfagia, sialorreia, reflexo anal ausente, perda de
1148 sensibilidade musculocutânea lombar bilateral e sensibilidade de cauda
1149 diminuída, evoluindo para decúbito esternal com dificuldade em se levantar e
1150 posteriormente decúbito lateral. Um bovino apresentou prurido intenso que
1151 resultou em automutilação na região do pescoço e nuca (Figura 3), e outros
1152 dois manifestaram vocalização. Dos oito animais, cinco morreram entre dois e
1153 cinco dias após o início do quadro, e três foram eutanasiados no segundo e
1154 terceiro dia após o início dos sinais clínicos. Cinco animais foram necropsiados
1155 e os achados de necropsia foram semelhantes, caracterizados por bexiga
1156 repleta, leptomeninges moderadamente hiperêmicas e fígado com padrão
1157 lobular evidenciado. No exame histopatológico do encéfalo, foram vistos
1158 manguitos perivasculares de linfócitos e plasmócitos, discreta gliose e no
1159 citoplasma de neurônios havia de inclusões eosinofílicas compatíveis com

1160 corpúsculos de Negri. Todos os animais examinados foram positivos para raiva
1161 na imunofluorescência direta.



1162
1163 Figura 3. Surto de raiva em bovinos confinados. Prurido com automutilação na região da
1164 cabeça, pescoço e nuca.

1165

1166 4 DISCUSSÃO

1167 O diagnóstico baseou-se no quadro clínico, nos achados de necropsia e
1168 histopatológico, e confirmado através da imunofluorescência direta. Tanto no
1169 Brasil como em outros países, a raiva é considerada como um diagnóstico raro
1170 em confinamentos (GAGEA et al., 2006; ESTIMA-SILVA et al., 2020).

1171 A ocorrência de casos em bovinos oriundos de uma mesma propriedade,
1172 a partir do 35º dia de chegada no confinamento, sugere que os animais foram
1173 introduzidos na nova localização já infectados, similar ao descrito na literatura
1174 (RAMÍREZ-ROMERO et al., 2014; CASTILLO et al., 2015; ESTIMA-SILVA et
1175 al., 2020; MARGINEDA et al., 2021). Os casos continuaram ocorrendo por até
1176 86 dias após a introdução destes animais, diferente com o período de
1177 incubação viral mais frequente, de 30 a 60 dias (BARROS et al., 2006), mas
1178 semelhante a casos já descritos que ocorreram por até 85 dias após a
1179 introdução dos bovinos (MARGINEDA et al., 2021).

No confinamento em que o surto ocorreu, a vacinação antirrábica não era realizada na entrada dos bovinos pelo fato da propriedade não estar em área considerada de risco para ocorrência da doença. Esta é uma prática frequente em confinamentos no Brasil pois a doença não é descrita (MARTINS, 2016) ou ocorre de forma isolada (ESTIMA-SILVA et al., 2020). Esta conduta justifica-se pelo fato do tempo de permanência dos bovinos nos confinamentos ser semelhante ao período de incubação da doença; logo, caso bovinos não imunizados sejam expostos ao vírus após a entrada no confinamento, estarão suscetíveis ao desenvolvimento da doença mesmo que a primovacinação tenha sido realizada no dia da chegada, visto que imunidade completa só se desenvolve após o reforço vacinal (LIMA et al., 2005). Salienta-se que, na ocorrência de um surto em bovinos introduzidos no confinamento já no período de incubação da doença, nenhuma medida de contenção pode ser adotada pois todos aqueles que estiverem nessa fase, terão evolução fatal.

A morbidade foi próxima aos valores descritos em surtos sob condições semelhantes nos quais esse coeficiente variou de 2,8% a 4,9% (RAMÍREZ-ROMERO et al., 2014; MARGINEDA et al., 2021). Na presente situação, o acompanhamento do surto durante todo o tempo de sua duração, permitiu determinação do número total de mortes e não apenas daquelas contabilizadas até o momento do diagnóstico, como ocorre em muitas situações (MELLO et al., 2019).

Embora os sinais clínicos observados sejam descritos com frequência na raiva em bovinos (BARROS et al., 2006; RIBAS et al., 2013), um dos animais apresentou prurido com automutilação. Este sinal é pouco relatado na raiva e considerado fortemente sugestivo de doença de Aujeszky (LANGOHR et al., 2003; BARROS et al., 2006), que deve ser considerada um diagnóstico diferencial na existência de sinais neurológicos e achados histológicos de encefalite mononuclear em bovinos. Baseando-se no período de evolução e nos sinais clínicos, outros diferenciais a serem considerados são causas de polioencefalomalacia, meningoencefalite trombótica, botulismo, listeriose, intoxicação por antibióticos ionóforos e deficiência de vitamina E e selênio, sendo possível diferenciá-los através do exame físico e dos achados de

necropsia e histopatológicos (BARROS et al., 2006; GAGEA et al., 2006; RAMÍREZ-ROMERO et al., 2014; QUEIROZ et al., 2018).

Pelo fato da raiva não ser descrita com frequência em confinamentos a doença nem sempre é uma suspeita nestes sistemas de produção. O presente relato reforça a importância da adoção de uma conduta diagnóstica que possibilite a realização do diagnóstico diferencial entre as possíveis causas de distúrbios neurológicos, que inclua a coleta adequada de materiais para o diagnóstico da raiva. Essa conduta significa o envio de todas as partes anatômicas pertinentes ao diagnóstico laboratorial, que incluem além do telencéfalo, a medula espinhal, o tronco encefálico e o GRH (gânglio trigêmeo, hipófise e rete mirable), sob refrigeração e, também no formol. O não encaminhamento destas partes anatômicas resulta em um elevado número de diagnósticos falso negativos (BASSUINO et al., 2016), e a sua análise reduz essa possibilidade mesmo em bovinos eutanasiados (RIBAS et al., 2013; WISSER et al., 2021).

1227

1228 **5 CONCLUSÃO**

1229

Embora a raiva não seja uma doença frequente em bovinos confinados, o presente estudo demonstra a importância de sua inclusão no diagnóstico diferencial diante de quadros neurológicos ou confundíveis com estes em sistemas de produção intensivos. Devido ao seu período de incubação, a doença pode ocorrer em áreas consideradas livres, quando os bovinos são introduzidos infectados nos confinamentos, o que torna os protocolos de vacinação realizados na entrada e durante o confinamento ineficientes. Assim, bovinos provenientes de áreas endêmicas devem ser submetidos a protocolos adequados de vacinação em suas propriedades de origem.

1239

1240

1241 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1242

1243 **ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes.**

1244 Beef Report – Perfil da Pecuária no Brasil. 2020. 49 p. Disponível em:

- 1245 <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/>. Acesso em 10 de setembro
1246 de 2021.
- 1247 BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; LEMOS, R.A.A. 2006.
1248 **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. Montes Claros, Brasil:
1249 Agnes, 207p, 2006.
- 1250 BASSUINO, D.M.; KONRADT, G.; CRUZ, R.A.S.; SILVA, G.S.; GOMES, D.C.;
1251 PAVARINI, S.P.; DRIEMEIER, D. Characterization of spinal cord lesions in
1252 cattle and horses with rabies: the importance of correct sampling. **Journal of**
1253 **Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 4, p. 455-460, 2016.
- 1254 CASTILLO, J.L.R.; VALLE, A.M.; BASULTO, G.E.M.; NAVARRO, F.J.M.;
1255 HURTADO, R.M.B.; VALENCIA, G.L. Report of rabies in feedlot cattle
1256 introduced to Baja California from the state of Guerrero, Mexico. **Turkish**
1257 **Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 39, p. 241-244, 2015.
- 1258 CHURCH, T.L.; RADOSTITS, O.M. A retrospective survey of diseases of
1259 feedlot cattle in Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v. 22, p. 27-30, 1981.
- 1260 CUNHA, P.H.J.; BANDARRA, P.M.; DIAS, M.M.; BORGES, A.S.; DRIEMEIER
1261 D. Surto de polioencefalomalacia por ingestão excessiva de enxofre na dieta
1262 em bezerros no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.
1263 8, p. 613-617, 2010.
- 1264 DOGNANI, R.; PIERRE, E.J.; SILVA, M.C.P.; PATRÍCIO, M.A.C.; COSTA,
1265 S.C.; PRADO, J.R.; LISBÔA, J.A.N. Epidemiologia descritiva da raiva dos
1266 herbívoros notificados no estado do Paraná entre 1977 e 2012. **Pesquisa**
1267 **Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1145-1154, 2016.
- 1268 ESTIMA-SILVA, P.; OLIVEIRA, P.A.; BRUHN, F.R.P.; SCHEID, H.V.;
1269 MARQUES, L.S.; RIBEIRO, L.S.; SCHILD A.L. Causes of death of beef cattle
1270 raised in feedlots. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 5, p. 333-339,
1271 2020.
- 1272 GALIZA, G.J.N.; SILVA, M.L.C.R.; DANTAS, A.F.M.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-
1273 CORREA, F. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino.
1274 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 267-276, 2010.
- 1275 GAGEA, M.I.; BATEMAN, K.G.B.; DREUMEL, T.; MCEWEN, B.J.; CARMAN,
1276 S.; ARCHAMBAULT, M.; SHANAHAN, R.A.; CASWELL, J.L. Diseases and
1277 pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. **Journal of**
1278 **Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 18-28, 2006.
- 1279 GRIFFIN D. Feedlot diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food**
1280 **Animal Practice**, v. 14, n. 2, p. 199-231, 1998.
- 1281 GUIZELINI, C.C.; LEMOS, R.A.A.; PAULA, J.P.L.; PUPIN, R.C.; GOMES, D.C.;
1282 BARROS, C.S.L.; NEVES, D.A.; ALCÂNTARA, L.O.B.; SILVA, R.O.S.;
1283 LOBATO, F.C.F.; MARTINS T.B. Type C botulism outbreak in feedlot cattle fed
1284 contaminated corn silage. **Anaerobe**, v. 55, p. 103-106, 2018.
- 1285 LANGOHR, I.M.; IRIGOYEN, L.F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. Aspectos
1286 epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de
1287 bovinos com raiva. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 125-131, 2003.

- 1288 LIMA, E. F.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R. S.; GOMES, A. A.B.; LIMA, F. S.
 1289 Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da
 1290 raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária**
 1291 **Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 250-264, 2005.
- 1292 LUCENA, R.B.; PIEREZAN, F.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; FIGHERA,
 1293 R.A.; BARROS, C.S.L. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos.
 1294 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 428-434, 2010.
- 1295 MALAFAIA, P.; GRANATO, T.A.L.; COSTA, R.M.; SOUZA, V.C.; COSTA,
 1296 D.F.A.; TOKARNIA, C.H. Major health problems and their economic impact on
 1297 beef cattle under two different feedlot systems in Brazil. **Pesquisa Veterinária**
 1298 **Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 837-843, 2016.
- 1299 MARGINEDA, C.; GIANNITI, F.; LIGUORI, E.; RUSSO, S.; CASTRO, D.J.;
 1300 ZIELINSKI G. Brote de rabia pareasiente bovina en la región libre de
 1301 enfermedad en la Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 53, p.
 1302 135-140, 2021.
- 1303 MARTINS, R.A. **Estudo da morbidade e mortalidade em confinamentos de**
 1304 **bovinos para terminação e seus impactos econômicos**. 2016. 92p.
 1305 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Medicina Veterinária,
 1306 Universidade Federal de Minas Gerais.
- 1307 MELLO, A.K.M.; BRUMATTI, R.C.; NEVES, D.A.; ALCÂNTARA, L.O.B.;
 1308 ARAÚJO, F.S.; GASPARG, A.O.; LEMOS, R.A.A. Bovine rabies: economic loss
 1309 and its mitigation through antirabies vaccination. **Pesquisa Veterinária**
 1310 **Brasileira**, v. 39, n. 3, p. 179-185, 2019.
- 1311 MOLOSSI, F.A.; CECCO, B.S.; POHL, C.B.; BORGES, R.B.; SONNE, L.;
 1312 PAVARINI, S.P.; DRIEMEIER D. Causes of death in beef cattle in southern
 1313 Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 33, n. 4, p. 677-
 1314 683, 2021.
- 1315 NICHOLS, C.A.; BREMER, V.R.; WATSON, A.K.; BUCKNER, C. D.; HARDING,
 1316 J. L.; KLOPFENSTEIN, T. J.; SMITH, D. R. The effect of sulfur and use of
 1317 ruminal available sulfur as a model to predict incidence of
 1318 polioencephalomalacia in feedlot cattle. **The Bovine Practitioner**, v. 47, n. 1, p.
 1319 47-53, 2013.
- 1320 PEIXOTO A.M. Evolução histórica da pecuária de corte no Brasil. In: Pires A.V.
 1321 (Ed.). **Bovinocultura de corte**. São Paulo, Brasil: FEALQ, vol. 1, p. 3-10, 2010.
- 1322 PUPIN, R.C.; LEAL, P.V.; PAULA, J.P.L.; GUIZELINI, C.C.; MÖCK, T.B.M.;
 1323 LEMOS, R.A.A.; GOMES, D.C. Cattle diseases in Mato Grosso do Sul, Brazil: a
 1324 24-year survey (1995-2018). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 9, p.
 1325 686-695, 2019.
- 1326 QUEIROZ, G.R.; OLIVEIRA, R.A.M.; FLAIBAN, K.K.M.C.; DI SANTIS, G.W.;
 1327 BRACARENSE, A.P.F.R.L.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.A.; LISBÔA, J.A.N.
 1328 Diagnóstico diferencial das doenças neurológicas dos bovinos no estado do
 1329 Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1264-1277, 2018.
- 1330 RAMÍREZ-ROMERO, R.; RAMÍREZ-HERNANDEZ, C.; GARCÍA-MARQUEZ,
 1331 L.J.; MACEDO-BARRAGÁN, R.J.; MARTÍNEZ-BURNES, J.; LÓPEZ-

- 1332 MAYAGOITIA, A. Bovine diseases causing neurological signs and death in
 1333 Mexican feedlots. **Tropical Animal Health and Production**, v.46, p. 823-829,
 1334 2014.
- 1335 RIBAS, N.L.K.S.; CARVALHO, R.I.; SANTOS, A.C.; VALENÇOELA, R.A.;
 1336 GOUVEIA, A.F.; CASTRO, M.B.; MORI, A.E.; LEMOS, R.A.A. Doenças do
 1337 sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. **Pesquisa**
 1338 **Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 10, p.1183-1194, 2013.
- 1339 RONDELLI, L.A.S.; SILVA, G.S.; BEZERRA, K.S.; RONDELLI, A.L.H.; LIMA,
 1340 S.R.; FURLAN, F.H.; PESCADOR, C.A.; COLODEL, E.M. Doenças de bovinos
 1341 em Mato Grosso diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da
 1342 UFMT (2005-2014). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 432-440,
 1343 2017.
- 1344 SANT'ANA, F.J.F.; RISSI, D.R.; LUCENA, R.B.; LEMOS, R.A.A.; NOGUEIRA,
 1345 A.P.A.; BARROS, C.S.L. Polioencefalomalacia em bovinos: epidemiologia,
 1346 sinais clínicos e distribuição das lesões no encéfalo. **Pesquisa Veterinária**
 1347 **Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 487-497, 2009.
- 1348 SOARES, M.C.; GASPAR, A.O.; BRUMATTI, R.C.; GOMES, D.C.; NEVES,
 1349 D.A.; ALCÂNTARA, L.O.B.; LEAL, P.V.; LEMOS, R.A.A. Economic impact of an
 1350 outbreak of botulismo in a cattle feedlot. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.
 1351 38, n. 7, p. 1365-1370, 2018.
- 1352 TERRA, J.P.; BLUME, G.R.; RABELO, R.E.; MEDEIROS, J.T.; ROCHA,
 1353 C.G.N.; CHAGAS, I.N.; AGUIAR, M.S.; SANT'ANA, F.J.F. Neurological
 1354 diseases of cattle in the state of Goiás, Brazil (2010-2017). **Pesquisa**
 1355 **Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1752-1760, 2018.
- 1356 WISSER, C.S.; FERNANDES, M.E.S.; MELCHIORETTO, E.; OGLIARI, D.;
 1357 GAVA, A.; BATISTA, H.B.C.R.; MORI, E.; TRAVERSO, S.D. Influence of
 1358 euthanasia, the intensity of inflammatory lesion and viral load in the laboratory
 1359 diagnosis of rabies in cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, p. 1-7,
 1360 2021.

CAPÍTULO 4

1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O botulismo é uma potencial causa de perdas em sistemas intensivos de produção de bovinos de corte podendo ser responsável por elevados índices de mortalidade. Para evitar estas perdas é imprescindível a adoção de protocolos sanitários adequados que incluem desde a vacinação correta dos bovinos e também o controle de qualidade dos alimentos fornecidos aos animais. A reprodução experimental da doença em ovinos é possível, mas quantificar as toxinas inoculadas nos animais é um desafio e, portanto, dificulta o estabelecimento de protocolos de tratamento, impedindo a determinação de dose de soro antibotulínico para a quantidade exata de toxinas. Este trabalho ainda fornece dados que demonstram que a vacinação dos animais nem sempre é eficaz, pois os altos índices da toxina botulínica influenciam na eficiência da vacina. Também é importante o estabelecimento de diagnósticos diferenciais com outras doenças que acometem o sistema nervoso e que podem ocorrer em bovinos criados sob condições intensivas, dentre essas destacam-se a raiva e a polioencefalomalacia. O primeiro para o controle destas doenças é o conhecimento da sua epidemiologia, sua caracterização clínica e patológica, os quais permitem um diagnóstico preciso e adoção de medidas eficientes de controle das mesmas.