

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Vigilância Epidemiológica

Manual Integrado de Vigilância Epidemiológica do

Botulismo

Série A. Normas e Manuais Técnicos



Brasília – DF
2006

© 2005 Ministério da Saúde.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é da área técnica.

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde:
<http://www.saude.gov.br/bvs>

O conteúdo desta e de outras obras da Editora do Ministério da Saúde pode ser acessado na página: <http://www.saude.gov.br/editora>

Série A. Normas e Manuais Técnicos

Tiragem: 1.ª edição – 2006 – 10.000 exemplares

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Secretaria de Vigilância em Saúde

Departamento de Vigilância Epidemiológica

Esplanada dos Ministérios, bloco G,

Edifício Sede, 1.º andar

70058-900 Brasília – DF

E-mail: svs@saude.gov.br

Home page: www.saude.gov.br/svs

Impresso no Brasil / *Printed in Brazil*

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.
Manual integrado de vigilância epidemiológica do botulismo / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2006.
88 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

ISBN 85-334-1030-1

1. Botulismo. 2. Vigilância epidemiológica. 3. Saúde pública. I. Título. II. Série.

NLM WC 268

Catálogo na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2006/0091

Títulos para indexação:

Em inglês: Integrated Manual of Epidemiological Surveillance of Botulism

Em espanhol: Manual Integrado de Vigilancia Epidemiológica de Botulismo

EDITORA MS

Documentação e Informação

SIA, trecho 4, lotes 540/610

71200-040 Brasília – DF

Tels.: (61) 3233-1774/2020

Fax: (61) 3233-9558

E-mail: editora.ms@saude.gov.br

Home page: <http://www.saude.gov.br/editora>

Equipe Editorial:

Normalização: Karla Gentil

Revisão: Lilian Assunção e Mara Pamplona

Capa, projeto gráfico e diagramação: Daniel Miranda

Agradecimento

À equipe de trabalho e a todos os pacientes de botulismo, cujas informações permitiram que esse manual fosse enriquecido com dados da descrição da doença no Brasil.

Sumário

1	Introdução	7
2	Definição	9
3	Etiologia	11
4	Modos de transmissão	13
4.1	Botulismo alimentar	13
4.2	Botulismo por ferimentos	13
4.3	Botulismo intestinal	13
4.4	Outras formas	14
5	Patogenia	15
6	Período de incubação	17
7	Quadro clínico	19
7.1	Botulismo alimentar	19
7.2	Botulismo por ferimentos	20
7.3	Botulismo intestinal	20
8	Diagnóstico clínico	21
8.1	Anamnese	21
8.2	Exame físico geral	21
8.3	Exame neurológico	22
9	Diagnóstico eletrofisiológico	23
10	Diagnóstico laboratorial	25
10.1	Coleta de amostras	25
10.1.1	Amostras clínicas	25
10.1.2	Amostras bromatológicas	28
10.1.3	Acondicionamento e transporte das amostras clínicas e bromatológicas para o laboratório	28
10.1.4	Exames laboratoriais	29
10.1.5	Interpretação de resultados laboratoriais	35

11 Diagnóstico diferencial	37
12 Tratamento.....	39
12.1 Tratamento de suporte.....	39
12.2 Tratamento específico	40
13 Complicações.....	43
14 Prognóstico	45
15 Vigilância epidemiológica	47
15.1 Objetivos da vigilância epidemiológica.....	47
15.2 Definição de caso	47
15.2.1 Definição de caso suspeito	47
15.2.2 Definição de caso confirmado.....	48
15.3 Critérios de encerramento.....	48
15.4 Notificação.....	49
15.5 Investigação frente a um caso suspeito	51
15.5.1 Investigação epidemiológica	51
15.5.2 Vigilância Sanitária	52
16 Conclusão e relatório final.....	53
17 Divulgação.....	55
18 Medidas de controle para toxina botulínica	57
19 Considerações finais.....	59
Referências bibliográficas	61
Glossário	63
Anexos.....	65
Anexo A – Sugestão de formulário de encaminhamento de amostras ao laboratório	65
Anexo B – Ficha de investigação epidemiológica.....	66
Anexo C – Tecnologias mais indicadas para o controle de toxina botulínica em alimentos	68
Anexo D – Detecção da toxina botulínica em laboratório	73
Anexo E – Manual de biossegurança para manipulação de <i>Clostridium botulinum</i> e sua toxina ..	80
Equipe técnica.....	87

1 Introdução

O botulismo foi primeiramente descrito na Alemanha, no século XVIII, após um surto associado à ingestão de salsicha de produção doméstica, de onde se originou o nome (*botulus* em latim significa salsicha).

O microorganismo foi identificado em 1897, na Bélgica, quando Emile Pierre Van Ermengen descreveu um surto em 23 membros de um clube de músicos que adoeceram e três morreram após a ingestão de presunto contaminado. Nessa ocasião, identificou-se a toxina botulínica tipo A. Em 1904, foi identificada a toxina tipo B. Em 1943, foi descrito o botulismo por ferimento e, em 1976, o botulismo infantil, atualmente conhecido como botulismo intestinal. A partir da década de 80, foram relatados casos de botulismo associadas ao uso de drogas inalatórias e injetáveis.

A distribuição da doença é mundial, com casos esporádicos ou surtos familiares, em geral relacionados à produção e conservação de alimentos de maneira inadequada.

No Brasil, a notificação de surtos e casos isolados passou a ser feita de forma sistemática a partir de 1999. Na maioria deles, a toxina identificada foi a do tipo A e os alimentos mais envolvidos foram conservas caseiras.

O botulismo é uma doença grave, de alta letalidade, que deve ser considerada como uma emergência médica e de saúde pública e a suspeita de um caso deve desencadear a imediata comunicação entre os profissionais da área da assistência e técnicos de vigilância epidemiológica. Para minimizar o risco de morte e seqüelas, é essencial que o diagnóstico seja feito rapidamente e que o tratamento seja instituído precocemente por meio das medidas gerais de urgência. A pronta investigação epidemiológica é básica para prevenir outros casos porventura decorrentes da ingestão de uma fonte alimentar comum e que pode estar ainda disponível para consumo.

2 Definição

O botulismo é uma doença não contagiosa, resultante da ação de uma potente neurotoxina. Apresenta-se sob três formas: botulismo alimentar, botulismo por ferimentos e botulismo intestinal. O local de produção da toxina botulínica é diferente em cada uma dessas formas, porém todas se caracterizam clinicamente por manifestações neurológicas e/ou gastrintestinais, podendo ter evolução grave, com necessidade de hospitalização prolongada.

3 Etiologia

O botulismo é causado por uma toxina produzida pelo *Clostridium botulinum*, um bacilo Gram positivo, anaeróbio, esporulado. São conhecidos oito tipos de toxinas botulínicas: A, B, C1, C2, D, E, F e G, das quais as do tipo A, B, E e F são patogênicas para o homem.

Os esporos do *C. botulinum* resistem a temperaturas de 120°C por 15 minutos. Estão amplamente distribuídos na natureza, no solo e em sedimentos de lagos e mares. São encontrados em produtos agrícolas como legumes, vegetais, mel, vísceras de crustáceos e no intestino de mamíferos e peixes.

As condições ideais para que a bactéria assuma a forma vegetativa, produtora de toxina são: anaerobiose, pH alcalino ou próximo do neutro (4,8 a 8,5), atividade de água de 0,95 a 0,97 e temperatura ótima de 37°C. Os tipos A e B se desenvolvem em temperaturas próximas das encontradas no solo (acima de 25° e até 40°C), enquanto o tipo E é capaz de proliferação a partir de 3°C.

A toxina botulínica é termolábil, sendo inativada pelo calor em uma temperatura de 80°C por, no mínimo, 10 minutos.

4 Modos de transmissão

O modo de transmissão tem importância na apresentação clínica e nas ações de vigilância epidemiológica.

4.1 Botulismo alimentar

Ocorre por ingestão de toxinas presentes em alimentos previamente contaminados e que foram produzidos ou conservados de maneira inadequada. Os alimentos mais comumente envolvidos são: conservas vegetais, principalmente as artesanais (palmito, picles, pequi); produtos cárneos cozidos, curados e defumados de forma artesanal (salsicha, presunto, carne frita conservada em gordura – “carne de lata”); pescados defumados, salgados e fermentados; queijos e pasta de queijos e, raramente, em alimentos enlatados industrializados.

4.2 Botulismo por ferimentos

Ocasionado pela contaminação de ferimentos com *Clostridium botulinum*, que em condições de anaerobiose, assume a forma vegetativa e produz toxina *in vivo*. As principais portas de entrada para os esporos são úlceras crônicas com tecido necrótico, fissuras, esmagamento de membros, ferimentos em áreas profundas mal vascularizadas, ou ainda, aqueles produzidos por agulhas em usuários de drogas injetáveis e lesões nasais ou sinusais em usuários de drogas inalatórias. É uma das formas mais raras de botulismo.

4.3 Botulismo intestinal

Resulta da ingestão de esporos presentes no alimento, seguida da fixação e multiplicação do agente no ambiente intestinal, onde ocorre a produção e absorção de toxina. A ausência da microbiota de proteção permite a germinação de esporos e a produção de toxina na luz intestinal. Ocorre com maior frequência em crianças com idade entre 3 e 26 semanas, e por isso foi inicialmente denominado de botulismo infantil. Em adultos, são descritos alguns fatores predisponentes como cirurgias intestinais, acloridria gástrica, doença de Crohn e/ou uso de antibióticos por tempo prolongado, que levaria à alteração da flora intestinal.

4.4 Outras formas

Embora raros, são descritos casos de botulismo acidental associados ao uso terapêutico ou estético da toxina botulínica e à manipulação de material contaminado, em laboratório (via inalatória ou contato com a conjuntiva).

Não há relato de transmissão interpessoal, apesar da excreção da toxina botulínica e dos esporos da bactéria por semanas ou meses nas fezes de lactentes com botulismo intestinal.

5 Patogenia

A toxina absorvida no trato gastrointestinal ou no ferimento dissemina-se por via hematogênica até as terminações nervosas, mais especificamente a membrana pré-sináptica da junção neuromuscular, bloqueando a liberação da acetilcolina. Conseqüentemente, haverá falha na transmissão de impulsos nas junções das fibras nervosas, resultando em paralisia flácida dos músculos que estes nervos controlam.

O alimento consumido juntamente com a toxina pode protegê-la do efeito deletério dos ácidos durante a passagem pelo estômago. O local de máxima absorção da toxina botulínica é o intestino delgado, de onde segue para o sistema linfático e posteriormente alcança a corrente sangüínea.

Existem dois grupos diferentes de *Clostridium botulinum*: os proteolíticos e os não proteolíticos. As cepas proteolíticas produzem uma pró-toxina que sofrerá ação de proteases do próprio microorganismo ainda no alimento e, nesses casos, a toxina é ingerida na forma ativa. Quando se trata de cepa não proteolítica, o alimento contém pró-toxinas que serão ativadas por ação das proteases existentes no trato digestivo do homem.

O dano causado na membrana pré-sináptica pela toxina é permanente. A recuperação depende da formação de novas terminações neuromusculares e, por este motivo, a recuperação clínica é prolongada, podendo variar de um a 12 meses.

6 Período de incubação

Quando o mecanismo de transmissão envolvido é a ingestão direta de toxina ou pré-toxina já presente no alimento, o período de incubação é menor e a doença se manifesta mais rapidamente. Quando ocorre a ingestão de esporos ou a contaminação de ferimentos, o período de incubação é maior porque a doença só se inicia após a transformação do *Clostridium botulinum* da forma esporulada para a vegetativa, que se multiplica e libera toxina.

Períodos de incubação curtos sugerem maior gravidade e maior risco de letalidade.

Botulismo alimentar: pode variar de duas horas a dez dias, com média de 12 a 36 horas. Quanto maior a concentração de toxina no alimento ingerido, menor o período de incubação.

Botulismo por ferimento: pode variar de quatro a 21 dias, com média de sete dias.

Botulismo intestinal: o período não é conhecido devido à impossibilidade de determinar o momento da ingestão de esporos.

7 Quadro clínico

As manifestações clínicas do botulismo serão descritas de acordo com o modo de transmissão.

7.1 Botulismo alimentar

A doença se caracteriza por instalação súbita e progressiva. Os sinais e sintomas iniciais podem ser gastrintestinais e/ou neurológicos. As manifestações gastrintestinais mais comuns são: náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal e podem anteceder ou coincidir com os sintomas neurológicos.

Os primeiros sinais e sintomas neurológicos podem ser inespecíficos tais como cefaléia, vertigem e tontura. O quadro neurológico se caracteriza por uma paralisia flácida motora descendente associado a comprometimento autonômico disseminado. Os sinais e sintomas começam no território dos nervos cranianos e evoluem no sentido descendente. Esta particularidade distingue o botulismo da síndrome de Guillain Barré, que é uma paralisia flácida aguda ascendente.

A disfunção dos nervos cranianos pode levar à visão turva, ptose palpebral uni ou bilateral, dificuldade de convergência dos olhos e diplopia decorrente da paralisia da musculatura extrínseca do globo ocular. Os movimentos dos globos oculares tornam-se limitados, podendo haver oftalmoplegia, no entanto, não há perda da acuidade visual. Por comprometimento do sistema nervoso autônomo, as pupilas tornam-se dilatadas e não fotorreagentes.

Os sinais e sintomas oculares são seguidos por fraqueza dos músculos responsáveis pela mastigação, deglutição e fala, o que pode levar à disfagia e à disartria. Além disso, pode se observar a redução dos movimentos da língua, do palato e da musculatura cervical (dificuldade para sustentar o pescoço).

Com a evolução da doença, a fraqueza muscular pode se propagar de forma descendente para os músculos do tronco e membros, o que pode ocasionar dispnéia, insuficiência respiratória e tetraplegia flácida. A fraqueza muscular nos membros é tipicamente simétrica, acometendo com mais intensidade os membros superiores do que os membros inferiores. Como a toxina produz bloqueio neuromuscular, os reflexos profundos ou osteotendinosos estão diminuídos ou abolidos nos membros acometidos.

A disfunção autonômica também causa boca seca, íleo paralítico, hipotensão sem taquicardia e retenção urinária.

Uma característica importante no quadro clínico do botulismo é a preservação da consciência. Na maioria dos casos, também não há comprometimento da sensibilidade, o que auxilia no diagnóstico diferencial com outras doenças neurológicas.

O botulismo pode apresentar progressão por uma a duas semanas e estabilizar por mais duas a três semanas, antes de iniciar a fase de recuperação. Esta fase tem duração variável, que depende da formação de novas sinapses e restauração da função. Nas formas mais graves, o período de recuperação pode durar de seis meses a um ano, embora os maiores progressos ocorram nos primeiros três meses após o início dos sinais e sintomas.

7.2 Botulismo por ferimentos

O quadro clínico é semelhante ao do botulismo alimentar, entretanto os sinais e sintomas gastrintestinais não são esperados e pode ocorrer febre decorrente de contaminação secundária do ferimento.

O botulismo por ferimento deve ser lembrado nas situações em que não se identifica uma fonte alimentar, especialmente em casos isolados da doença.

Ferimentos ou cicatrizes nem sempre são encontrados e focos ocultos, como em mucosa nasal, seios da face e pequenos abscessos em locais de injeção, devem ser investigados, especialmente em usuários de drogas.

7.3 Botulismo intestinal

Nas crianças, o aspecto clínico do botulismo intestinal varia de quadros com constipação leve à síndrome de morte súbita. Manifesta-se inicialmente por constipação e irritabilidade, seguidos de sinais neurológicos, caracterizados por dificuldade de controle dos movimentos da cabeça, sucção fraca, disfagia, choro fraco, hipoatividade e paralisias bilaterais descendentes, que podem progredir para comprometimento respiratório. Casos leves caracterizados apenas por dificuldade alimentar e fraqueza muscular discreta têm sido descritos.

Em adultos, suspeita-se de botulismo intestinal na ausência de fontes prováveis de toxina botulínica, como alimentos contaminados, ferimentos ou uso de drogas.

O botulismo intestinal tem duração de duas a seis semanas, com instalação progressiva dos sinais e sintomas por uma a duas semanas seguida de recuperação em três a quatro semanas.

8 Diagnóstico clínico

A anamnese e o exame físico e neurológico do paciente são imprescindíveis para o diagnóstico do botulismo.

Na suspeita de botulismo alimentar, também deve ser verificado: tipos de alimentos ingeridos, tempo decorrido da ingestão e aparecimento da doença, existência de outros casos, fonte comum de ingestão, além dos sinais e sintomas apresentados.

8.1 Anamnese

Para a investigação das doenças neurológicas que se manifestam por fraqueza muscular descendente, é necessário realizar anamnese cuidadosa, buscando identificar fatores de risco específicos para determinadas doenças.

- Manifestações clínicas: avaliar o início e a progressão dos principais sinais e sintomas neurológicos apresentados.
- Sinais e sintomas associados: questionar presença de febre, vômito, diarreia, constipação. A presença de convulsão indica o comprometimento do sistema nervoso central e afasta o botulismo.
- Avaliar história alimentar: identificar os alimentos ingeridos nos últimos três dias e quando possível até dez dias; a quantidade e origem dos alimentos.
- Identificar outros fatores de risco: ferimentos, imunização e infecções virais recentes, picada de insetos, viagens, exposição a agentes tóxicos, medicamentos e uso de drogas endovenosas.
- Investigar outras pessoas com sinais e sintomas semelhantes.

8.2 Exame físico geral

De forma geral, prevalecem os sinais e sintomas neurológicos, sendo estes os primeiros e mais importantes achados ao se examinar o paciente. Sinais de desidratação, distensão abdominal e dispnéia podem estar presentes. Não há febre, a menos que haja uma complicação infecciosa. No botulismo por ferimento, pode ocorrer febre secundária à infecção da ferida por outras bactérias. A frequência cardíaca é normal ou baixa se não houver hipotensão (presente nas formas graves, com disfunção autonômica).

8.3 Exame neurológico

- Avaliar o nível de consciência: no botulismo não há comprometimento cognitivo, o paciente permanece orientado no tempo e espaço, sem alterações de memória e responde a comandos. O paciente pode apresentar fraqueza muscular global e dificuldade para falar, o que dificulta a avaliação do seu estado mental. É importante identificar os músculos menos atingidos, dando ao paciente a oportunidade de responder às perguntas por meio de gestos, estabelecendo um canal de comunicação.
- Avaliar o déficit de força muscular nos membros: solicitar ao paciente para executar movimentos com os membros. Caso alguns movimentos estejam preservados, avaliar o déficit em cada grupo de músculos de acordo com o grau de resistência a uma força contrária. O exame da força muscular é um instrumento importante para avaliação da progressão da doença.
- Avaliar o comprometimento da musculatura ocular, facial e bulbar: pedir ao paciente para seguir objetos com os olhos em todas as direções. Este é um teste simples para avaliar fraqueza da musculatura ocular extrínseca, responsável pelos movimentos do globo ocular. Quando há assimetria ou limitação dos movimentos oculares, o paciente frequentemente queixa-se de diplopia.
- Verificar os movimentos da língua e do palato.
- Verificar os movimentos da face, solicitando ao paciente que sobre, assovie ou tente manter os olhos fechados contra a resistência.
- Verificar os reflexos profundos (aquileu, patelar, bicipital, tricipital, estilo-radial), usando um martelo adequado. No botulismo, os reflexos profundos estão diminuídos ou abolidos nos membros acometidos.
- Verificar a sensibilidade: com um objeto pontiagudo, não cortante, identificar zonas de diminuição da sensibilidade. O exame deve ser iniciado pelas extremidades dos membros com progressão para regiões mais próximas do tronco. A sensibilidade profunda pode ser avaliada executando-se movimentos de flexão-extensão dos artelhos e perguntando ao paciente sobre a posição dos mesmos após cada movimento (ele deve responder sem o auxílio da visão).
- Verificar o comprometimento do sistema nervoso autônomo: avaliar a frequência dos movimentos peristálticos, pesquisar as pupilas (simetria, tamanho e reatividade à luz) e a lubrificação da boca e dos lábios.
- Verificar a acuidade visual: no botulismo, o paciente pode apresentar turvação leve da visão, sem outras alterações.
- Certificar-se de que o paciente tem a audição preservada. No botulismo não ocorre déficit auditivo, embora sensações vertiginosas possam ser referidas.

9 Diagnóstico eletrofisiológico

A eletroneuromiografia é um exame que permite identificar se a lesão no sistema nervoso periférico localiza-se na raiz, nos plexos, no nervo, no músculo ou na junção neuromuscular. Dessa forma, este exame é de grande valor no diagnóstico de botulismo ao demonstrar o comprometimento da junção neuromuscular, mais especificamente da membrana pré-sináptica, causada pela toxina botulínica. Além disso, o exame auxilia no diagnóstico diferencial com outras doenças com quadros clínicos semelhantes.

Os achados eletrofisiológicos no botulismo podem ser sumarizados da seguinte forma:

- o estudo da condução nervosa sensitiva é normal, quando alterado afasta o diagnóstico de botulismo;
- o estudo da condução nervosa motora é normal, porém, dependendo do grau de comprometimento da doença, pode-se observar uma redução da amplitude do potencial composto motor com um estímulo único;
- a estimulação repetitiva do nervo, com frequência de 20Hz e 50Hz, demonstra um aumento da amplitude do potencial do composto motor.

As alterações do exame de eletroneuromiografia se correlacionam com a gravidade da doença e com sua progressão. Sendo assim, o exame pode ser normal no início dos sintomas, dependendo do grau de comprometimento da patologia. As alterações eletrofisiológicas são encontradas enquanto houver déficit de força muscular, desaparecendo após a recuperação clínica do paciente.

10 Diagnóstico laboratorial

Nos casos de botulismo alimentar, o diagnóstico laboratorial é baseado na análise de amostras clínicas e de amostras bromatológicas. Os exames visam evidenciar a presença de toxina botulínica em material procedente dos casos e em alimentos suspeitos. A cultura do *Clostridium botulinum* pode ser considerada auxiliar do diagnóstico, em condições especiais, como exemplo no caso de suspeita de botulismo intestinal e por fermentos.

10.1 Coleta de amostras

A coleta de amostras clínicas e bromatológicas devem ser realizadas com assepsia e em condições de segurança para o técnico responsável pela mesma.

10.1.1 Amostras clínicas

A coleta de amostras clínicas (soro, lavado gástrico, fezes/conteúdo intestinal) deve ser realizada o mais precocemente possível e anteceder a administração do soro antitoxinico (SAB), para evitar que a toxina ativa seja neutralizada antes da coleta. A coleta tardia pode impedir a detecção de toxina, pois esta vai sendo absorvida pelos tecidos em função do tempo. Após oito dias do início da doença, a toxina não é mais encontrada. Quando a concentração de toxina circulante é pequena, a possibilidade de confirmação laboratorial é menor.

A seleção de amostras de interesse e oportunas para o diagnóstico laboratorial é variável de acordo com a forma de botulismo (quadro 1) e estão descritas a seguir:

Soro

- A coleta de sangue para diagnóstico laboratorial deve ser feita nos primeiros dias da doença, com no máximo sete dias após o início dos sintomas, em quantidade suficiente para obter 11ml de soro. Não sendo possível, coletar duas amostras em momentos diferentes ou pelo menos 2ml de soro para realização do exame de diagnóstico presuntivo (quadro 2). A coleta da amostra deve ser realizada antes da administração do soro antitoxinico. Amostras coletadas em momentos diferentes devem ser mantidas em separado.

- Usar recipiente sem anticoagulante e fracionar o soro nas primeiras duas horas após a coleta. Pode-se utilizar centrífuga, preferencialmente refrigerada, a 2.000-2.500 rpm por 10-15 minutos, ou até que o soro esteja livre de hemácias. A amostra de soro deve ser conservada sob refrigeração.
- Verificar, junto aos laboratórios dos serviços médicos, se há soro do paciente coletado nos primeiros dias da doença. Geralmente há coleta de sangue e soro para realização de exames de rotina.

Fezes/conteúdo intestinal e vômito/lavado gástrico

- Para a realização do diagnóstico completo, coletar no mínimo 15g ou ml. Estas amostras têm valor diagnóstico desde que coletadas precocemente (quadro 2). O trânsito intestinal acelerado aumenta a velocidade de eliminação da toxina pelas fezes, por isso, quando há diarreia, as amostras devem ser coletadas imediatamente após a suspeição clínica de botulismo (até 72h). Em caso de constipação intestinal, a coleta do lavado intestinal pode ser realizada até seis dias depois do início dos sintomas.
- Para obter lavado gástrico ou intestinal, utilizar solução fisiológica a 0,9%.
- As amostras de fezes e conteúdo intestinal são úteis tanto para a detecção de toxinas quanto para a pesquisa do *Clostridium botulinum* e devem ser acondicionadas em recipiente adequado, à prova de vazamentos. Nesse material estão presentes, principalmente, as formas esporuladas que suportam a exposição à atmosfera comum. Por isso, não são necessárias as condições de anaerobiose (meios adicionados de redutores, como a rezazurina ou tubos mantidos em condições de anaerobiose).

Material de ferimentos

- A coleta do exsudato deve ser realizada na parte mais profunda do ferimento, com auxílio de zaragatoa (*swab*). O material de ferimento destina-se somente à detecção do *Clostridium botulinum*.
- Utilizar meios de cultura para o transporte que contenham substâncias redutoras, como o meio de tioglicolato semi-sólido, adicionado de rezazurina, uma vez que no ferimento a bactéria encontra-se em sua forma vegetativa e pode ser inativada pela atmosfera comum. Não sendo possível usar meio de cultura, acondicionar a zaragatoa (*swab*) em tubo de ensaio e vedá-lo com cuidado, encaminhando ao laboratório no prazo máximo de 30 minutos.

Quadro 1. Tipos de amostras para diagnóstico laboratorial de acordo com a forma clínica do botulismo

Amostras clínicas	Botulismo alimentar	Botulismo intestinal	Botulismo por ferimento
Para detecção de toxina botulínica			
Soro	Sim	Sim ¹	Sim ¹
Fezes ou conteúdo intestinal	Sim	Sim	Não
Lavado gástrico	Sim	Não	Não
Exsudato do ferimento	Não	Não	Não
Para cultura do <i>Clostridium botulinum</i>			
Soro	Não	Não	Não
Fezes ou conteúdo intestinal	Não	Sim	Não ²
Lavado gástrico	Não	Não	Não ²
Exsudato do ferimento	Não	Não	Sim

¹ No caso de botulismo por ferimento e botulismo intestinal em crianças, a toxina pode ser encontrada no soro, porém não é regra.

² Se houver suspeita ou possibilidade do ferimento estar localizado no trato gastrointestinal, incluir a coleta destas amostras.

Nota: com exceção das amostras de soro, as demais podem ser usadas também para cultura do *Clostridium botulinum*.

Quadro 2. Período máximo de tempo, após o início dos sintomas, para a coleta oportuna de amostras clínicas e quantidade mínima necessária para o diagnóstico laboratorial

Amostras	Período máximo para coleta	Quantidade (diagnóstico presuntivo)	Quantidade (diagnóstico confirmatório)	Quantidade (diagnóstico específico) (1)	Total
Soro	8 dias	1,5ml	2,5ml	6,5ml*	10,5ml
Fezes/conteúdo intestinal					
Com diarreia inicial	3 dias	3g	4g	8g*	15g
Com constipação intestinal	6 dias	3g	4g	8g*	15g
Sem alteração do trânsito intestinal	4 dias	3g	4g	8g*	15g
Lavado gástrico/vômito	3 dias	3g	4g	8g*	15g

* Diagnóstico específico, considerando testes com as antitoxinas A, B, E e F.

Sempre que possível, coletar as amostras em quantidades superiores às indicadas para o diagnóstico específico.

10.1.2 Amostras bromatológicas

- As amostras bromatológicas também devem ser coletadas e enviadas o mais precocemente possível ao Laboratório Central de Saúde Pública.
- Coletar todas as sobras e restos dos produtos efetivamente consumidos.
- Evitar a transferência das sobras ou restos (ou ambos) para outro recipiente, mesmo que se encontre em condições precárias de integridade física ou de presença de sujidades. Caso não existam sobras ou restos, coletar o recipiente vazio que as continham originalmente.
- Na ausência absoluta de amostras de alimentos não consumidos, coletar outras que pertençam ao mesmo lote (amostras industrializadas) ou que tenham sido produzidas no mesmo local e data e pela mesma pessoa ou grupo de pessoas (amostras artesanais ou domésticas). Entretanto, deve-se considerar que a distribuição da toxina botulínica, entre unidades do mesmo lote, não é homogênea. No caso de positividade, este resultado é forte indício de que outras unidades podem estar contaminadas pela toxina. No caso de resultado negativo, não se descarta a possibilidade de que a unidade consumida pelo caso suspeito contenha a toxina.
- Nas amostras bromatológicas é comum encontrar formas esporuladas do *Clostridium botulinum*, em especial no mel. É importante salientar que neste alimento, devido ao alto conteúdo de açúcar e baixa atividade de água, o esporo não tem condições de germinar e, portanto, não há produção de toxina.

10.1.3 Acondicionamento e transporte das amostras clínicas e bromatológicas para o laboratório

- Para o acondicionamento das amostras, selecionar recipientes limpos e de preferência esterilizados, hermeticamente fechados. Caso seja amostra de alimento contida em uma embalagem, não transferir para outro recipiente, coletar todo o conjunto. Vedar ou tampar o recipiente que contém a amostra, garantindo que não ocorrerá vazamento do produto.
- Quando a amostra estiver contida em frascos de vidro ou similares que podem quebrar durante o transporte, protegê-los com auxílio de algodão, tiras plásticas com bolhas de ar, caixas de papelão próprias para o envio de pequenas amostras ou outro dispositivo.

Nos casos de botulismo por ferimento, enviar a amostra em temperatura AMBIENTE.

- Todas as amostras devem ser enviadas ao laboratório devidamente identificadas. As amostras clínicas devem conter os seguintes dados: nome do paciente, idade, município de residência, tipo de amostra coletada, data e hora da coleta, finalidade do exame (pesquisa de toxina botulínica e/ou cultura) e devem estar acompanhadas de um formulário de encami-

nhamento para cada amostra (anexo A). As amostras bromatológicas devem ser enviadas com os termos de coleta próprios da vigilância sanitária, que devem conter as seguintes informações: tipo de alimento, data e hora da coleta, local da coleta, município, data da produção, data de validade, marca, lote. O mesmo é válido para alimentos de produção caseira.

- O laboratório deve ser avisado do envio da amostra, que pode chegar ao laboratório em horários não convencionais de trabalho, pois a mesma deverá ser recebida de imediato, inspecionada e armazenada de forma adequada no momento do recebimento.
- O laboratório responsável pelo recebimento e encaminhamento das amostras para o laboratório de referência de botulismo deverá verificar a ficha de encaminhamento, identificação das amostras, condições de acondicionamento e refrigeração. Em caso de dúvida ou de identificação incorreta, deverá entrar em contato com a unidade que as enviou para os esclarecimentos necessários.
- Conservar e transportar as amostras sob refrigeração de 4 a 8° C. A refrigeração das amostras é indispensável, pois a toxina botulínica é termolábil, podendo ser inativada em temperaturas acima da ambiental. O tempo de transporte não deve ultrapassar 48 horas.
- Para o transporte, acondicionar a amostra protegida em caixas isotérmicas. Evitar o uso de gelo comum, dando preferência ao gelo reaproveitável. Se não for possível evitar o uso de gelo comum, acondicioná-lo em saco plástico e fechá-lo de forma a não permitir que a água de degelo espalhe no interior da caixa isotérmica. A quantidade de gelo deve ser proporcional ao tempo de transporte, recomendando-se pelo menos três dispositivos de gelo reaproveitável ou dois sacos plásticos com aproximadamente 300g de gelo por conjunto de duas amostras.
- No laboratório de referência para botulismo, nenhuma amostra deverá ser desprezada até que o caso/surto seja encerrado.

10.1.4 Exames laboratoriais

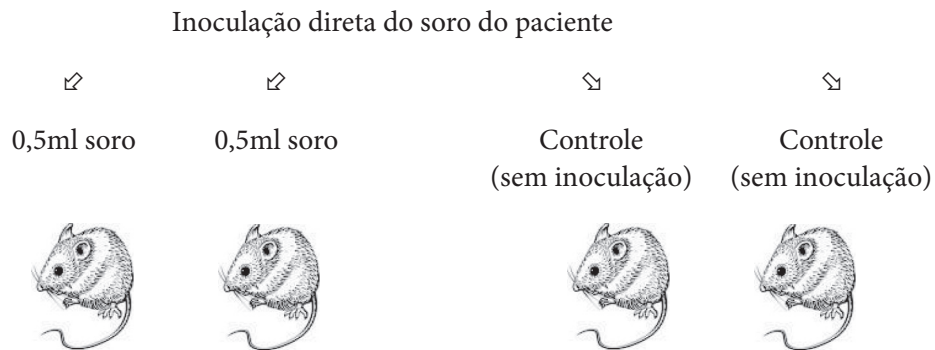
Os exames laboratoriais podem ser realizados por várias técnicas, sendo que a mais comum é a detecção da toxina botulínica por meio de bioensaio em camundongos, que é feito em três etapas: presuntiva, confirmatória e específica.

Em casos de botulismo por ferimentos e botulismo intestinal realiza-se também o isolamento de *Clostridium botulinum* por meio de cultura das amostras. A metodologia de cada exame está apresentada resumidamente nas figuras abaixo e detalhadamente no anexo D.

Figura 1. Etapa presuntiva do bioensaio em camundongos para soro

Objetivo: confirmar presença de substância tóxica

Tempo para resultado: até quatro dias



Interpretação: Após a inoculação, nas primeiras seis horas, os animais são observados no máximo a cada 30 minutos e em intervalos de três a quatro horas, por até 72 horas, para verificar possíveis alterações no comportamento e estado físico dos camundongos.

Os animais inoculados com a porção não tratada podem ou não morrer. Caso morram, significa que a toxina ativa estava presente na amostra. Caso ocorram mortes nos camundongos que só receberam a porção tripsinizada, significa que a pré-toxina estava presente na amostra e que, para tipificação da toxina é necessário tripsinizar o restante do material extraído. A sobrevivência dos camundongos que receberam a porção fervida confirma a termolabilidade da toxina. Os animais controles não devem apresentar nenhum sinal da doença e nem ir a óbito.

*Não ferver e não tripsinizar o soro.

Figura 2. Etapa presuntiva do bioensaio em camundongos para amostras clínicas (exceto soro) e bromatológicas

Objetivo: confirmar presença de substância tóxica e termolábil

Tempo para resultado: até quatro dias

Amostra bromatológica (alimentos) e/ou **Amostra clínica** (exceto soro)



Extração de toxina em gel fosfato

[1:1 – 1 parte de amostra (g) + 1 parte de gel fosfato (ml)]



Deixar uma noite em geladeira



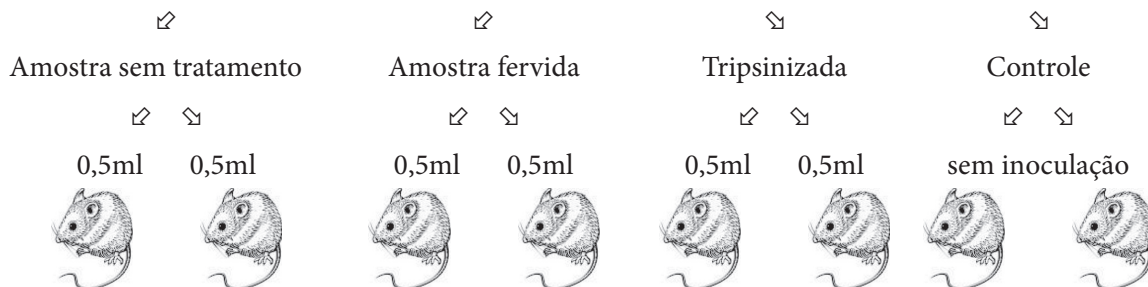
Centrifugar

(4°C a 2500 a 3000 rpm por no máximo 20 min.)



Coletar sobrenadante

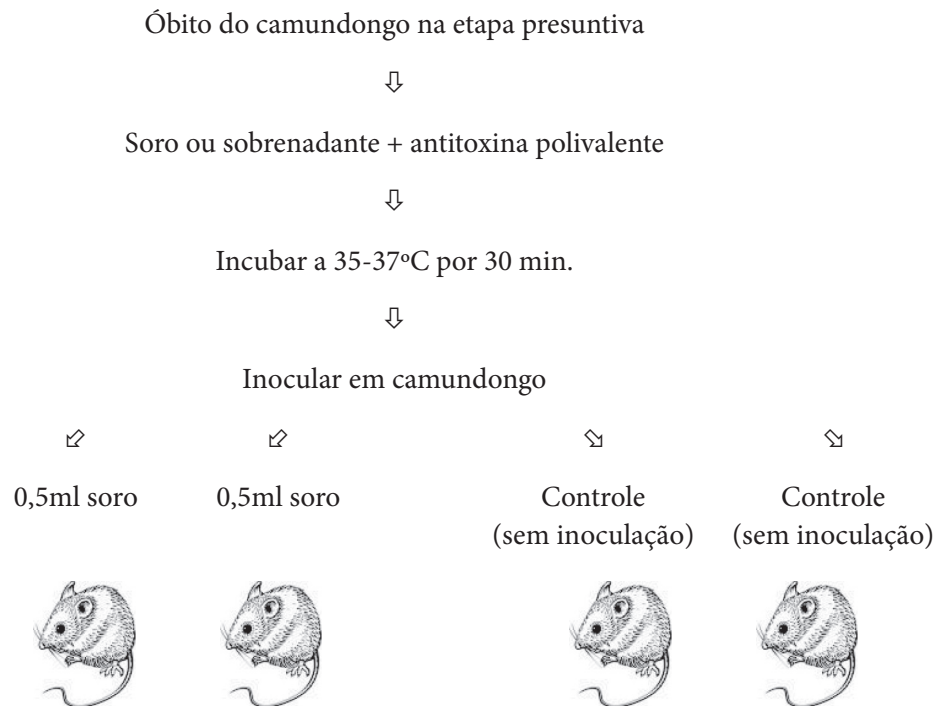
(dividir em porções)



Interpretação: Após a inoculação, nas primeiras seis horas, os animais são observados no máximo a cada 30 minutos e em intervalos de três a quatro horas, por até 72 horas, para verificar possíveis alterações no comportamento e estado físico dos camundongos. Os animais inoculados com a porção não tratada podem ou não morrer. Caso morram, significa que a toxina ativa estava presente na amostra. Caso ocorram mortes nos camundongos que só receberam a porção tripsinizada, significa que a pré-toxina estava presente na amostra e que, para tipificação da toxina é necessário tripsinizar o restante do material extraído. A sobrevivência dos camundongos que receberam a porção fervida confirma a termolabilidade da toxina. Os animais controles não devem apresentar nenhum sinal da doença e nem ir a óbito. *Não tripsinizar fezes e lavado intestinal. A toxina, se presente, já foi tripsinizada pelo metabolismo do paciente.

Figura 3. Etapa confirmatória do bioensaio em camundongos

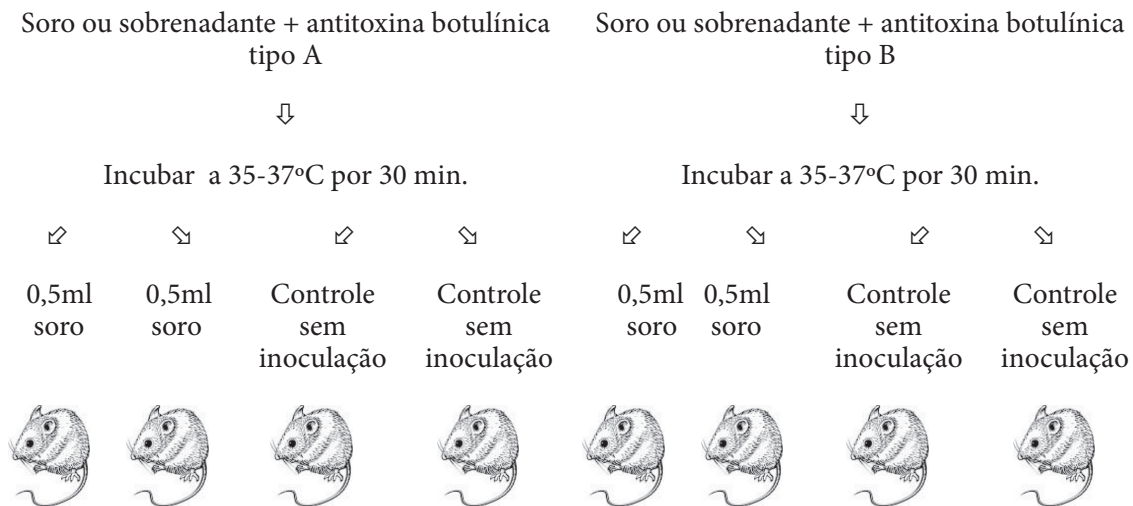
Objetivo: confirmar presença de toxina botulínica. Realizar essa etapa somente se a etapa presuntiva for positiva.



Interpretação: Observar sinais nos camundongos. Quando há presença de toxina botulínica no soro ou sobrenadante, esta é inativada pelo soro polivalente, portanto não se espera que o camundongo morra. No entanto, o óbito não deve descartar a presença de toxina botulínica na amostra.

Figura 4. Etapa específica do bioensaio em camundongos

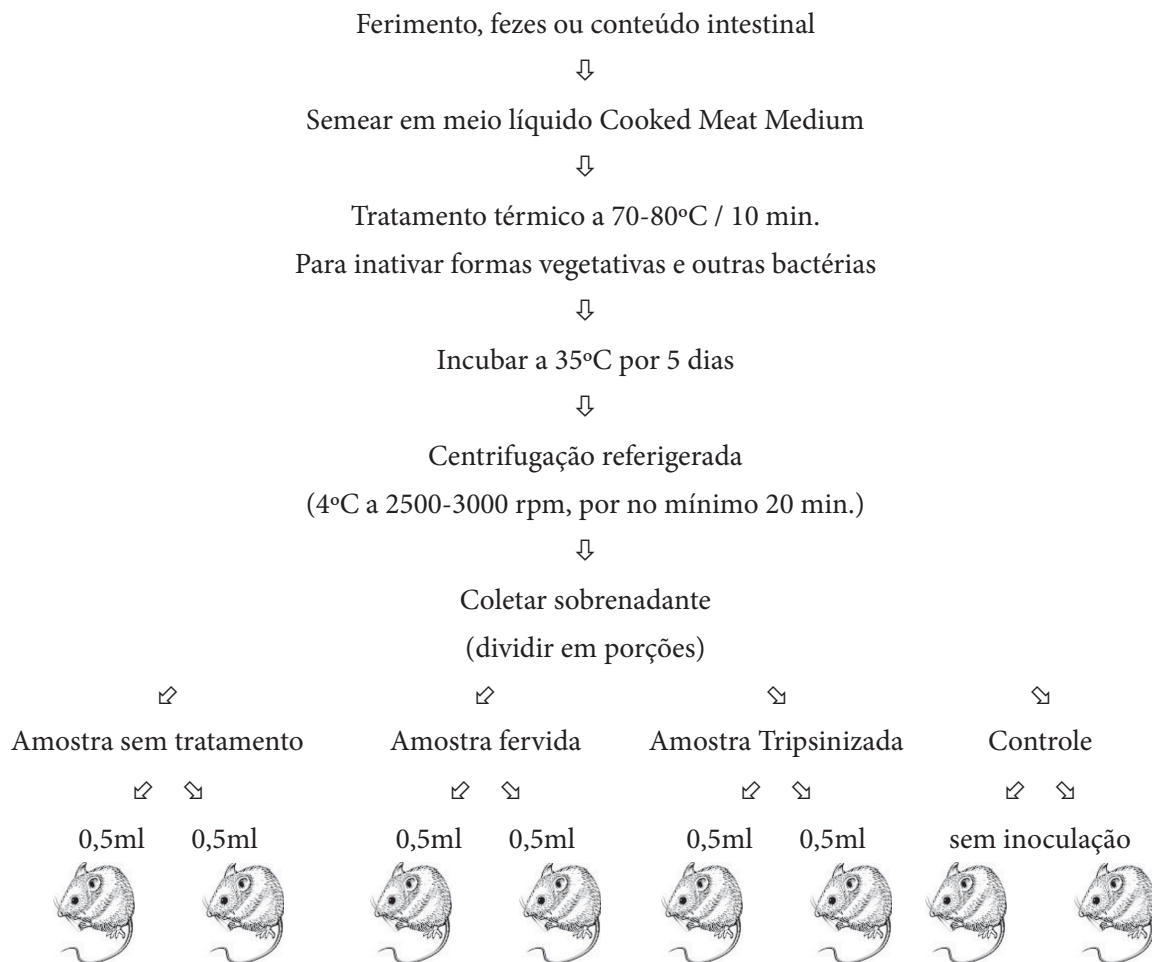
Objetivo: determinar o tipo de toxina botulínica



Interpretação: A antitoxina tipo A deverá neutralizar a toxina botulínica tipo A, assim como a antitoxina tipo B deverá neutralizar a toxina botulínica tipo B. Os camundongos que sobreviverem indicarão o tipo de toxina presente na amostra inoculada. Se os camundongos que receberam antitoxina botulínica tipo A morrerem, a toxina da amostra analisada é do tipo B. Se sobreviverem, a toxina da amostra analisada é do tipo A. Se os camundongos que receberam antitoxina botulínica tipo B morrerem, a toxina da amostra analisada é do tipo A. Se sobreviverem, a toxina da amostra analisada é do tipo B.

Figura 5. Cultura (botulismo por fermento e botulismo intestinal)

Objetivo: Isolamento de *Clostridium botulinum* e identificação bioquímica da bactéria (provas de lipase e lecitinase)



10.1.5 Interpretação de resultados laboratoriais

Quadro 3. Interpretação dos resultados do bioensaio em camundongos

Resultado	Interpretação
Presuntivo	<p>Indica a presença de toxina termolábil que causa sintomas compatíveis com botulismo.</p> <p>Após inoculação, caso os camundongos apresentem pêlos eriçados, dispnéia, dificuldade de locomoção, “cintura de vespa” e morte, sugere-se que a amostra inoculada continha toxina.</p> <p>Sugere-se que a toxina era termolábil se os camundongos inoculados com amostra fervida sobreviver e os outros morrerem.</p> <p><u>Amostra tripsinizada e sem tratamento</u></p> <p>Camundongo morto ⇨ Presença de toxina na amostra</p> <p><u>Amostra fervida</u></p> <p>Camundongo vivo ⇨ Presença de toxina termolábil na amostra</p>
Confirmatório	<p>Confirma a presença de toxina botulínica, sem especificar o tipo.</p> <p>A técnica baseia-se na neutralização da amostra com antitoxina polivalente e posterior inoculação em dois camundongos. Se a amostra tiver toxina botulínica, esta deverá ser neutralizada pela antitoxina polivalente adicionada, por isso espera-se que os camundongos sobrevivam.</p> <p>Camundongo vivo ⇨ Presença de toxina botulínica na amostra</p>
Específico	<p>Confirma e especifica o tipo de toxina botulínica.</p> <p>A técnica baseia-se na neutralização específica da toxina botulínica contida na amostra. A antitoxina monovalente neutralizará apenas a toxina botulínica específica presente na amostra, com isso o camundongo não deverá morrer.</p> <p><u>Amostra + antitoxina botulínica tipo A</u></p> <p>Camundongo vivo ⇨ Presença de toxina botulínica tipo A na amostra (toxina tipo A da amostra foi neutralizada pela antitoxina A, por isso o camundongo sobreviveu)</p> <p>Camundongo morto ⇨ Presença de outro tipo de toxina botulínica na amostra</p> <p><u>Amostra + antitoxina botulínica tipo B</u></p> <p>Camundongo vivo ⇨ Presença de toxina botulínica tipo B na amostra (toxina tipo B da amostra foi neutralizada pela antitoxina B, por isso o camundongo sobreviveu)</p> <p>Camundongo morto ⇨ Presença de outro tipo de toxina botulínica na amostra</p>
Negativo	<p>Não encontrada evidência de toxina botulínica.</p> <p>Os camundongos irão sobreviver, pois não havia presença de toxina botulínica nas amostras inoculadas.</p>

Sempre que é evidenciada a presença da toxina botulínica no soro sanguíneo do caso suspeito por bioensaio em camundongo, o diagnóstico está confirmado e não necessita de outros exames laboratoriais ou da determinação da toxina em outras amostras do mesmo paciente.

11 Diagnóstico diferencial

Muitas doenças neurológicas podem manifestar-se com fraqueza muscular súbita e paralisia flácida aguda. O quadro 4 mostra os principais critérios utilizados para diferenciá-las do botulismo.

Quadro 4. Diagnóstico diferencial de botulismo

Condição	Fraqueza muscular	Sensibilidade	Características do liquor
Botulismo	Inicia pela face Descendente e simétrica	Normal	Normal
Síndrome de Guillain-Barré	O envolvimento da face é menos comum que no botulismo Ascendente e simétrica	Em alguns casos pode haver déficit sensitivo	Dissociação proteínocitológica Hiperproteínorraquia Celularidade normal ou discretamente elevada (≤ 50 células/mm ³) Na primeira semana pode ser normal
Síndrome de Müller Fisher (variante da Síndrome Guillain Barré)	Fraqueza simétrica da face Diplegia facial Ptose palpebral Dificuldade de mastigação e de deglutição Não há comprometimento de membros superiores e inferiores	Parestesias ou diminuição da sensibilidade da face e da língua.	Dissociação proteínocitológica Hiperproteínorraquia Celularidade normal ou discretamente elevada (≤ 50 células/mm ³)
Miastenia Gravis	Flutuante no transcorrer do dia, piora com atividade física e melhora com repouso A maioria dos casos se inicia por ptose palpebral e diplopia	Normal	Normal

Além destas, existem outras doenças menos comuns que também devem ser consideradas no diagnóstico diferencial:

- Doença de Lyme: considerada rara no Brasil, é causada pela *Borrelia burgdorferi* transmitida pela picada de carrapato do gênero *Ixodes*. Após um período inicial de manifestações cutâneas (eritema migratório), adenomegalia e mialgia, instala-se um quadro de meningoradiculite caracterizado por cefaléia intensa, paralisia proximal e simétrica dos membros. Paralisia facial uni ou bilateral pode ocorrer, mas envolvimento da motricidade ocular é incomum.
- Neuropatia diftérica: é rara no Brasil. A polineuropatia tem início 5 a 12 dias após a faringite e se caracteriza por instalação de dificuldade de deglutição, rouquidão e paralisia do palato. Depois de alguns dias, pode surgir fraqueza muscular dos quatro membros e déficit sensitivo de grau variável.
- Neuropatias tóxicas: podem ser produzidas por metais pesados (chumbo, arsênio, mercúrio e outros) ou agentes industriais (solventes). O indicativo para o diagnóstico é a história de exposição direta ou indireta às substâncias nocivas. A neuropatia tem evolução lenta e raramente há envolvimento facial.
- Neuropatias tóxicas alimentares: os principais alimentos são alguns peixes e sementes de algumas frutas. Pode haver parestesias na boca e língua seguidas de polineuropatia de grau variável.
- Outros quadros neurológicos e/ou psiquiátricos: meningoencefalites, acidente vascular cerebral, traumatismo cranioencefálico, transtornos conversivos (histeria), hipopotassemia, intoxicação por atropina, beladona, metanol, monóxido de carbono, fenotiazínicos e envenenamento por curare.

Por ser uma doença do sistema nervoso periférico, o botulismo não está associado a sinais de envolvimento do sistema nervoso central. A presença das manifestações abaixo relacionadas, em indivíduo previamente normal, é argumento contra a possibilidade desta doença:

- movimentos involuntários;
- diminuição do nível de consciência;
- ataxia;
- crises epiléticas (convulsões);
- espasticidade, hiperreflexia profunda, presença de clônus ou sinal de Babinski e sinais de liberação piramidal nos membros acometidos por fraqueza;
- assimetria significativa da força muscular;
- déficit sensitivo.

Quadros de gastroenterite pelo *Campylobacter* podem ser seguidos de síndrome de Guillain-Barré.

12 Tratamento

O êxito da terapêutica do botulismo está diretamente relacionado à precocidade com que é iniciada e às condições do local onde será realizada. O tratamento deve ser realizado em unidade hospitalar que disponha de terapia intensiva (UTI). Observa-se significativa redução da letalidade quando o paciente é tratado nessas unidades. Basicamente, o tratamento da doença apóia-se em dois conjuntos de ações: tratamento de suporte e tratamento específico.

12.1 Tratamento de suporte

As medidas gerais de suporte e monitorização cardiorrespiratória são as condutas mais importantes no tratamento do botulismo.

A disfagia, regurgitação nasal, comprometimento dos movimentos da língua, palato e, principalmente, da musculatura respiratória são sinais indicativos de gravidade e exigem atenção redobrada e ação imediata para evitar broncoaspiração e insuficiência respiratória. Nesses casos, a assistência ventilatória é essencial para evitar o óbito, podendo ser necessária por quatro (toxina tipo B) a oito semanas (tipo A) ou mais se houver complicações.

O tratamento de suporte baseia-se fundamentalmente nos seguintes procedimentos:

- Assistência ventilatória pode ser necessária para cerca de 30 a 50% dos casos. Para se indicar a entubação traqueal num paciente com botulismo, não é necessário esperar que a PCO_2 esteja elevada ou que a saturação de O_2 diminua, pois a espera de tais sinais pode representar maior risco de instalação da insuficiência respiratória. Os critérios para indicação de entubação são essencialmente clínicos. Para indicá-la, pode-se basear em:
 - cuidadosa avaliação da capacidade do paciente em garantir a permeabilidade das vias aéreas superiores. As paralisias podem causar asfixia e obstruções respiratórias altas (observar a mobilidade da língua e do palato, disfonia e disfagia);
 - capacidade vital (aferida por espirômetro): em geral, a entubação é indicada quando a capacidade vital é menor que 12ml/Kg.

- Traqueostomia nem sempre é necessária, devendo ter sua indicação avaliada individualizando-se cada caso.
- Lavagens gástricas, enemas e laxantes podem ser úteis nos casos de botulismo alimentar, com o objetivo de eliminar a toxina do aparelho digestivo, exceto nos casos em que houver íleo paralítico.
- Hidratação parenteral e reposição de eletrólitos, além de alimentação por meio de sondas, devem ser mantidos até que a capacidade de deglutição seja recuperada.
- Outros procedimentos rotineiros em UTI também devem ser adotados.

Aminoglicosídeos e tetraciclina podem piorar a evolução do botulismo, especialmente em crianças, devido à redução da entrada de cálcio no neurônio potencializando o bloqueio neuromuscular.

12.2 Tratamento específico

Visa a eliminar a toxina circulante e a sua fonte de produção, o *C. botulinum*, pelo uso do soro antitoxinotico (SAB) e de antibióticos. Antes de iniciar o tratamento específico, todas as amostras clínicas para exames diagnósticos devem ser coletadas.

O soro antitoxinotico atua contra a toxina circulante que ainda não se fixou no sistema nervoso, por isso recomenda-se que o tratamento com SAB seja realizado o mais precocemente possível (até sete dias) ou poderá não mais ser eficaz. Apresenta-se em forma de soro heterólogo, equino, geralmente em apresentação bi ou trivalente (contra os tipos A e B ou A, B e E de toxina botulínica). A dose é de uma ampola de antitoxina botulínica bi ou trivalente por via intravenosa, diluída em solução fisiológica a 0,9%, na proporção de 1:10, para infundir em aproximadamente uma hora.

A solicitação do SAB para as unidades de tratamento deve ser feita pelo médico que diagnosticou o caso ou pelo pessoal de vigilância epidemiológica sempre que a mesma é acionada inicialmente (figura 6). Sua liberação estará condicionada ao preenchimento da ficha de notificação do caso suspeito junto à prescrição e ao relatório sucinto do quadro clínico.

A indicação da antitoxina deve ser criteriosa, pois não é isenta de riscos uma vez que 9 a 20% das pessoas tratadas podem apresentar reações de hipersensibilidade. O teste cutâneo de sensibilidade antes do uso de soros heterólogos foi excluído da rotina, conforme normas do Programa Nacional de Imunização, da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (PNI/SVS/MS). O valor preditivo deste teste é considerado discutível.

Para prevenir a ocorrência de reações de hipersensibilidade, proceder da seguinte forma:

- instalar soro fisiológico;

- administrar hidrocortisona (10mg/kg) por via endovenosa (máximo de 1g), 10 a 15 minutos antes de iniciar a soroterapia.

Nos casos de botulismo por ferimento, recomenda-se o uso de penicilina cristalina na dose de 10 a 20 milhões de UI/dia para adultos e 300.000UI/kg/dia para crianças, em doses fracionadas de 4/4 horas, IV, por 7 a 10 dias. O metronidazol também pode ser utilizado, na dose de 2g/dia para adultos e 15mg/kg/dia para crianças, IV, de 6/6 horas.

Debridamento cirúrgico deve ser realizado nos casos de botulismo por ferimento, preferencialmente após o uso do SAB, mesmo quando a ferida tem bom aspecto.

No botulismo intestinal em menores de um de idade, acredita-se que a lise de bactérias na luz intestinal, provocada pelo antibiótico, pode piorar a evolução da doença por aumento dos níveis de toxina circulante. Em adultos, esse efeito não tem sido descrito, mas deve ser considerado quando a porta de entrada para a doença for o trato digestivo. O SAB e a antibioticoterapia não estão indicados para crianças menores de um ano de idade com botulismo intestinal.

No botulismo alimentar, a indicação de antibióticos ainda não está bem estabelecida.

13 Complicações

Desidratação e pneumonia por aspiração podem ocorrer precocemente, antes mesmo da suspeita de botulismo ou do primeiro atendimento no serviço de saúde. Infecções respiratórias podem ocorrer em qualquer momento da hospitalização, sendo a longa permanência sob assistência ventilatória e os procedimentos invasivos, importante fatores de risco.

14 Prognóstico

Um tratamento de suporte metuculoso pode resultar em completa recuperação.

A letalidade do botulismo diminui de forma considerável quando a assistência médica dos pacientes é prestada em unidades de terapia intensiva. Mortes precoces geralmente resultam da falha em reconhecer a gravidade da doença e do retardo em iniciar a terapia. Quando ocorrem após a segunda semana, resultam de complicações, como as associadas à ventilação prolongada.

15 Vigilância epidemiológica

O botulismo passou a ser doença de notificação compulsória a partir da Portaria n.º 1.943/MS, de 18 de outubro de 2001 (BRASIL, 2001). Devido à gravidade da doença e à possibilidade de ocorrência de outros casos resultantes da ingestão da mesma fonte de alimentos contaminados, um caso é considerado um surto e uma emergência de saúde pública. A suspeita de um caso de botulismo exige notificação e investigação imediatas.

15.1 Objetivos da vigilância epidemiológica

- Detectar precocemente os casos, visando a promover assistência adequada e a reduzir a morbidade e letalidade da doença;
- Caracterizar o surto por tempo, lugar e pessoa;
- Identificar a fonte de contaminação e modo de transmissão dos casos de botulismo;
- Propor medidas de prevenção e controle, em tempo oportuno, para impedir a ocorrência de novos casos;
- Avaliar as medidas de controle implantadas.

15.2 Definição de caso

Há definição de caso suspeito e confirmado para cada forma de botulismo.

15.2.1 Definição de caso suspeito

- Caso suspeito de botulismo alimentar e botulismo por ferimentos:
 - indivíduo que apresente paralisia flácida aguda, simétrica, descendente, com preservação do nível de consciência, caracterizado por um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: visão turva, diplopia, ptose palpebral, boca seca, disartria, disfagia ou dispnéia.

A exposição a alimentos potencialmente suspeitos para presença da toxina botulínica, nos últimos dez dias ou história de ferimentos nos últimos 21 dias, reforça a suspeita.

- **Caso suspeito de botulismo intestinal:**

- criança menor de um ano com paralisia flácida aguda de evolução insidiosa e progressiva que apresente um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: constipação, sucção fraca, disfagia, choro fraco, dificuldade de controle dos movimentos da cabeça;
- adulto que apresente paralisia flácida aguda, simétrica, descendente, com preservação do nível de consciência, caracterizado por um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: visão turva, diplopia, ptose palpebral, boca seca, disartria, disfagia ou dispnéia na ausência de fontes prováveis de toxina botulínica como: alimentos contaminados, ferimentos ou uso de drogas.

A exposição a alimentos com risco para presença de esporo de *C. botulinum* (ex.: mel, xaropes de milho) reforça a suspeita em menores de um de idade.

15.2.2 Definição de caso confirmado

- Critério laboratorial
 - caso suspeito no qual foi detectada a toxina botulínica em amostra clínica e/ou no alimento efetivamente consumido;
 - caso suspeito de botulismo intestinal ou por ferimento no qual foi isolado o *Clostridium botulinum*, produtor de toxinas em fezes ou material obtido do ferimento.
- Critério clínico-epidemiológico
 - caso suspeito com vínculo epidemiológico com o caso confirmado;
 - caso suspeito com história de consumo de alimento com risco para a presença da toxina botulínica dez dias antes dos sintomas;
 - caso suspeito com eletroneuromiografia compatível com botulismo;
 - caso suspeito com ferimento em condições de anaerobiose nos últimos 21 dias.

15.3 Critérios de encerramento

Os casos podem ser encerrados pelos seguintes critérios:

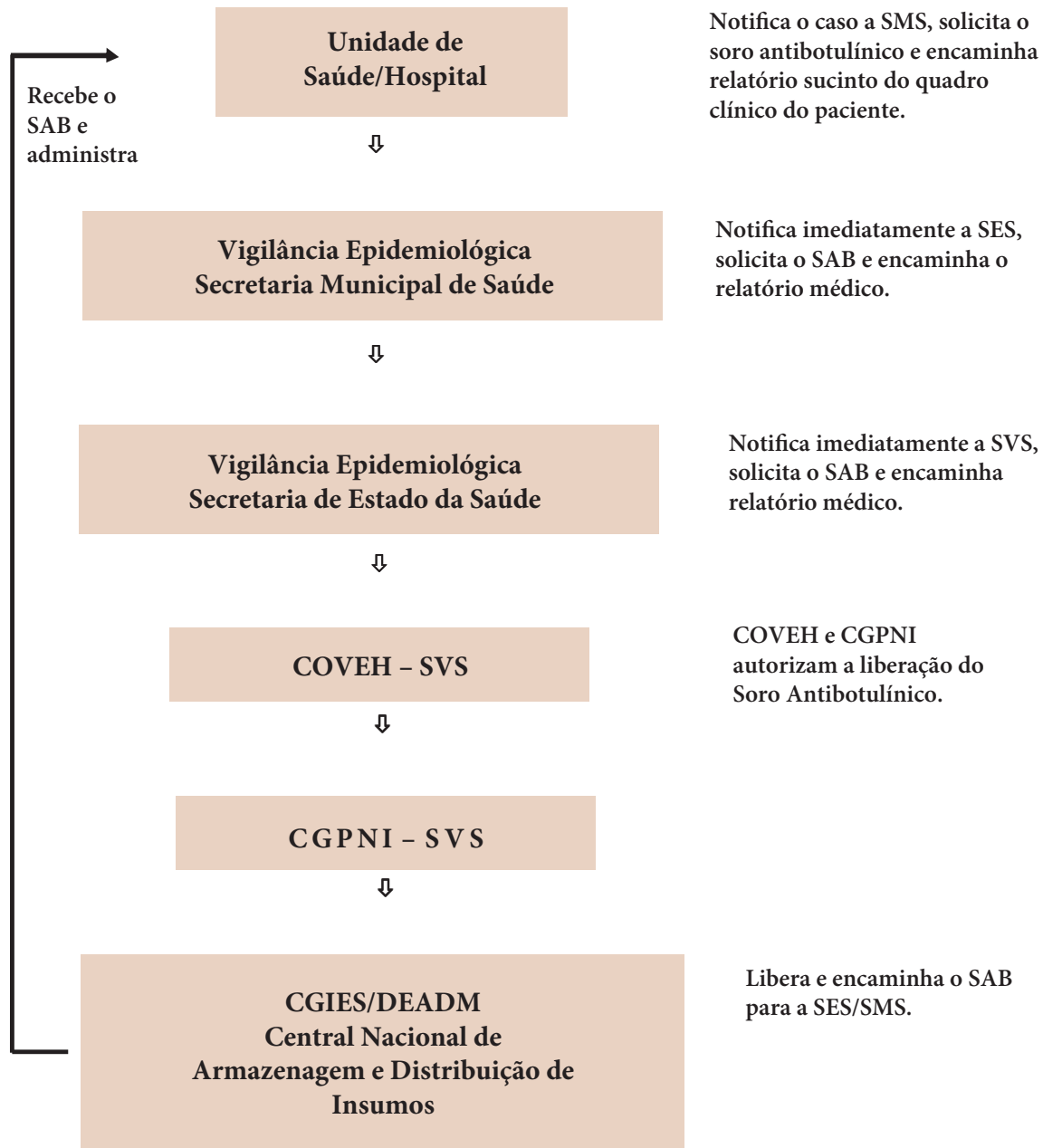
- Critério laboratorial
 - Quando houver detecção de toxina botulínica em amostra clínica e/ou alimento, efetivamente consumido, ou isolamento do *Clostridium botulinum*, produtor de toxinas em fezes ou material obtido do ferimento.

- Critério clínico-epidemiológico
 - Quando o caso não for encerrado pelo critério laboratorial e quando houver presença de vínculo epidemiológico, com o caso confirmado e/ou história de consumo de alimento com risco para a presença da toxina botulínica, dez dias antes dos sintomas e/ou eletro-neuromiografia compatível com botulismo e/ou com ferimento em condições de anaerobiose nos últimos 21 dias.
- Óbito
 - Indivíduo que foi a óbito com quadro clínico compatível com botulismo, com confirmação clínico-epidemiológica e/ou clínico-laboratorial.

15.4 Notificação

Diante da suspeita clínica de botulismo, o profissional da unidade de saúde que atendeu o paciente deve notificá-lo imediatamente à vigilância epidemiológica local. O técnico que recebeu a notificação deve, inicialmente, verificar a consistência das informações e, uma vez caracterizada a suspeita de botulismo, comunicar imediatamente aos níveis hierárquicos superiores e áreas envolvidas na investigação conforme figura 6. A solicitação do soro antibotulínico deve ser feita, nessa fase, à Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (COVEH), da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, mediante prescrição médica e relatório sucinto do quadro clínico.

Figura 6. Fluxograma da notificação de caso suspeito de botulismo e solicitação de soro antitoxinogênico



15.5 Investigação frente a um caso suspeito

Diante de um caso ou surto suspeito de botulismo, a investigação deve ser realizada, de maneira integrada, entre as áreas de vigilância epidemiológica, vigilância sanitária, laboratório, assistência e outras áreas que se fizerem necessárias. A cooperação e o intercâmbio de informações entre as áreas envolvidas são fatores essenciais para a boa qualidade da investigação.

A coordenação da investigação deve, preferencialmente, ser delegada a um profissional da vigilância epidemiológica, que terá a responsabilidade de informar e acionar os demais membros da equipe.

Os serviços devem estar organizados para providenciar imediatamente técnicos para realizar a investigação, inclusive aos sábados, domingos e feriados, bem como prover transporte, diárias, formulários, material para coleta de amostras e outros materiais para garantir a agilidade e qualidade da investigação.

As condutas frente a um caso suspeito variam de acordo com a área envolvida descritas a seguir.

15.5.1 Investigação epidemiológica

Todo caso de botulismo deverá ser investigado imediatamente após a notificação, e a ficha de investigação epidemiológica (anexo B) deve ser devidamente preenchida para cada caso notificado.

Quando se tratar de botulismo alimentar, o caso ou surto também deve ser notificado ao Sistema de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA). Com isso, além da ficha individual de investigação epidemiológica de botulismo, utilizar também os formulários e metodologia de investigação de surto de DTA.

Antes de iniciar as atividades de campo, o técnico responsável pela investigação deve solicitar a coleta de amostras clínicas para pesquisa de toxina botulínica, bem como orientar que amostras bromatológicas permaneçam acondicionadas sob refrigeração até que a vigilância sanitária chegue.

Na maioria dos casos, a notificação é posterior aos primeiros dias de sinais e sintomas, impossibilitando a coleta de amostras clínicas desse período. Sendo assim, é importante que se procure amostras de soro e fezes do caso suspeito em todas nos laboratórios públicos, privados ou conveniados das unidades de saúde/hospitais em que esse caso foi atendido. Caso as encontre, encaminhar ao laboratório estadual de saúde pública, juntamente com amostras coletadas após a notificação.

As principais atividades a serem desenvolvidas durante a investigação epidemiológica são:

- viabilizar o encaminhamento oportuno do soro antibotulínico (SAB);
- assegurar coleta oportuna, acondicionamento e transporte de amostras clínicas e/ou bromatológicas;

- investigar a história alimentar do caso suspeito nos últimos dez dias para identificar ingestão de alimentos de risco;
- caracterizar detalhadamente o quadro clínico do caso suspeito e a evolução de cada sinal e sintoma por data e hora;
- verificar a história prévia de ferimentos e uso de drogas injetáveis e inalatórias;
- realizar busca ativa de casos suspeitos e outras pessoas expostas ao mesmo risco entre familiares e nas unidades de saúde;
- orientar as medidas iniciais de prevenção e controle, de acordo com o modo de transmissão;
- eliminar a permanência da fonte, por meio da interrupção do consumo, distribuição e comercialização dos alimentos suspeitos, no caso de botulismo alimentar;
- orientar a população sobre o preparo, conservação e consumo adequado dos alimentos associado ao risco de adoecimento;
- Propor medidas de prevenção e controle pertinentes, de acordo com os resultados da investigação do caso.

15.5.2 Vigilância Sanitária

Na suspeita de surto de botulismo alimentar, a vigilância sanitária exerce atividade importante na investigação do surto. A seguir, segue um resumo das atividades desencadeadas:

- coletar sobras ou restos de alimentos consumidos pelo caso suspeito e/ou amostras de alimentos não consumidas, conforme descrito anteriormente;
- identificar a forma e objetivo da produção (industrial/artesanal e comercial/familiar) e origem do produto;
- obter informações sobre o produto como: marca, local de aquisição, data de validade, de fabricação, lote, quando foi aberto, onde e como estava armazenado e informações do rótulo;
- no caso de produção artesanal ou doméstica, descrever os ingredientes usados, modo de preparo, forma de acondicionamento e de conservação, data e responsável pela elaboração, quantidade produzida, data da abertura/consumo e forma de conservação;
- realizar inspeção sanitária para verificação das condições higiênico-sanitárias;
- analisar os perigos e pontos críticos de controle da produção dos alimentos envolvidos, visando a verificar as falhas que permitiram a produção e manutenção da toxina ativa;
- adotar medidas sanitárias cabíveis de acordo com a legislação vigente e a situação encontrada.

16 Conclusão e relatório final

A ficha de investigação epidemiológica de botulismo de todos os casos suspeitos deve ser encaminhada, aos órgãos hierárquicos superiores e a digitação dos dados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan).

Além da ficha de investigação epidemiológica, as informações de todas as áreas envolvidas na investigação deverão ser consolidadas em um relatório final que deve ser integrado e ter o seguinte conteúdo:

- dados do(s) caso(s): número de casos, idade, sexo, ocupação, local de residência
- data da notificação e investigação
- data de início dos sinais e sintomas
- período de incubação
- história alimentar e outros fatores de exposição
- sinais e sintomas
- tratamento
- amostras coletadas e exames realizados
- resultados laboratoriais
- fonte de transmissão
- fluxograma do alimento com pontos críticos
- classificação final
- evolução

Em suspeita de surto de botulismo alimentar com vários casos suspeitos, adicionar ao relatório a curva epidêmica por data de início dos sintomas, a tabela com o cálculo das taxas de ataque e risco relativo de cada alimento, bem como enviar o relatório final da VE-DTA.

17 Divulgação

Em cada nível hierárquico deve ser definido o responsável pela divulgação dos resultados da investigação.

O relatório final deve ser encaminhado para todas as áreas envolvidas na investigação, garantindo o retorno das informações aos técnicos e setores envolvidos, incluindo as medidas adotadas e/ou previstas.

As informações também devem ser divulgadas em boletins eletrônicos, nos boletins das Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde, em congressos e em revistas científicas, bem como aos casos e familiares e à comunidade.

18 Medidas de controle para toxina botulínica

Apesar da toxina botulínica ser letal e apenas uma pequena quantidade dela causar doença, a toxina é termolábil e pode ser destruída se aquecida a 80°C por, no mínimo, 10 minutos.

Para a prevenção da produção de toxina botulínica pelo *Clostridium botulinum*, é importante que se faça:

- prevenção de germinação de esporos;
- processamento térmico adequado de alimentos enlatados e outros processos como salga e secagem, fermentação ou acidificação;
- boas práticas de higiene.

A manutenção apropriada da temperatura de armazenamento abaixo de 3,3°C não é uma medida eficaz, já que o *Clostridium botulinum* tipo E pode multiplicar-se em baixas temperaturas e os sintomas causados por essa cepa são muito graves. Os fatores que controlam o crescimento de *Clostridium botulinum* e a conseqüente produção de toxina são apresentados no quadro 5 e no anexo C.

Quadro 5. Fatores que afetam o crescimento de *Clostridium botulinum*

Parâmetros	Valores	Para o <i>C. botulinum</i> E
Temperatura mínima	10°C	3,3°C
Temperatura máxima	50°C	45°C
pH mínimo	4,6	-
pH máximo	9,0	-
Aw mínima	0,94	0,965
% máxima de NaCl	10	-

Fonte: HACCP – Instrumento essencial para a inocuidade de alimentos, 2001.

19 Considerações finais

Com vistas ao alcance dos objetivos da vigilância epidemiológica do botulismo, faz-se necessário ressaltar a importância de:

- envolvimento e compromisso das gerências e profissionais das áreas participantes;
- definição de prioridades e planejamento das ações das áreas técnicas envolvidas;
- sensibilização da área assistencial para realizar o diagnóstico clínico e notificar os casos suspeitos;
- cumprimento do fluxo de informação definido, respeitando os níveis hierárquicos;
- divulgação dos resultados das investigações realizadas para profissionais de saúde e população em geral, visando à conscientização da população para a importância da prevenção do botulismo;
- desenvolver processos educativos para a mobilização da população para a prevenção do botulismo.

Referências bibliográficas

BENENSON, A. S. (Ed.). *Manual para el control de las enfermedades transmisibles*. 17. ed. Washington: OPS, 2001.

BIOSAFETY in the laboratory: prudent practices for the handling and disposal of infectious materials. Washington: National Research Council, National Academy Press, 1989.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Instrução Normativa n.º 7, de 6 de junho de 1997. O Trabalho em Contenção com Organismos Geneticamente Modificados (OGMs). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 jun. 1997. n.º 133, seção 3, p. 11827–11833.

_____. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Guia de vigilância epidemiológica*. 5. ed. rev. amp. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002.

_____. Ministério da Saúde. Portaria n.º 1943, de 18 de outubro de 2001. Define a relação de doenças de notificação compulsória para todo território nacional. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 out. 2001.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso*. 4. ed. rev. amp. Brasília, 2004.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de análise de perigos e pontos críticos de controle*. Versão preliminar. No prelo.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual integrado de vigilância epidemiológica de doenças transmitidas por alimentos*. Versão preliminar. [Brasília], 2006. No prelo.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Relatórios de surtos do EPI_SUS*. No prelo.

CENTER FOR DISEASE CONTROL OFFICE OF BIOSAFETY. *Classification of etiological agents on the basis of hazard*. 4th. ed. U.S.: Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, 1974.

ESCARTIN, E. F. *Microbiologia e inocuidad de los alimentos*. México: Universidad Autonoma de Queretero, 2000. Modificado.

FAVERO, M. S.; BOND, W. W. Sterilization, disinfection and antisepsis in the hospital. In: LENNETTE, E. H. et al. *Manual of clinical microbiology*. 4th. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. p. 183-200.

FRANCIOSA, G., AURELI, P.; SCHECHTER, R. *International handbook of foodborne pathogens*. New York: Miliotis, M. & Bier, J.W. Marcel Dekker, 2003. cap. 5.

HOLZER, E. Botulism caused by inhalation. *Med. Klin.*, Munich, v. 41, p.1735-1740, 1962.

JACOBSON, J. T.; ORLOB, R. B.; Clayton, J. L. Infections acquired in clinical laboratories in Utah. *J. Clin. Microbiol.*, [S. l.], v. 21, p. 486-489, 1985.

LEITÃO, M. F. F. et al. *Tratado de microbiologia*. São Paulo: Ed. Manole, 1988. p. 46-49.

LETTAU, L. A. Nosocomial transmission and infection control aspects of parasites and ectoparasitic diseases: Part I. Introduction/enteric parasites. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, [S. l.], v. 12, p. 59-65, 1991.

_____. Nosocomial transmission and infection control aspects of parasites and ectoparasitic diseases: part II: blood and tissue parasites. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, [S. l.], v. 12, p. 111-121, 1991.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. *HACCP: instrumento essencial para a inocuidade de alimentos*. Buenos Aires: OPAS/INPPAZ, 2001.

PIKE, R. M. Laboratory-associated infections: incidence, fatalities, causes and prevention. *Ann. Rev. Microbiol.*, [S. l.], v. 33, p. 41-66, 1979.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. *Botulismo: manual de orientação para profissional de saúde*. São Paulo, 1999.

SILVA JR., E. A. *Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos*. 5. ed. São Paulo: Varela, 2002.

STERNE, M.; WERTZEL, L. M. A new method of large-scale production of high-titer botulinum formol-toxoid types C and D. *J. Immunol.*, [S. l.], v. 65, p. 175-183, 1950.

Glossário

- Ataxia** (Sinônimos – deficiência de coordenação, dissinergia, incoordenação): dificuldade na habilidade em desempenhar movimentos voluntários coordenados suaves. Esta condição pode afetar os membros, tronco, olhos, faringe, laringe e outras estruturas.
- Diplopia** (Sinônimos – visão dupla, poliopia, poliopsia): sintoma visual em que um único objeto é percebido pelo córtex visual como dois objetos, em vez de um.
- Disartria:** transtornos da articulação da fala, causados por coordenação imperfeita da faringe, laringe, língua ou músculos faciais.
- Disfagia:** transtornos de deglutição.
- Disfonia:** transtorno da fonação.
- Diplegia:** paralisia bilateral simétrica.
- Dispnéia:** encurtamento da respiração, dificuldade ou distúrbio subjetivo da respiração, em geral associado a doença cardíaca ou pulmonar.
- Hemiparesia:** paralisia parcial dos músculos de uma metade do corpo (emprega-se o sufixo ple-gia quando a paralisia é total).
- Hipostesia:** diminuição da sensibilidade.
- Miastenia:** debilidade muscular.
- Midríase:** dilatação das pupilas maior que 6mm, combinada com a insuficiência das pupilas em contrair quando estimuladas com luz.
- Nistagmo:** tremor dos olhos.
- Paraparesia:** paralisia incompleta dos membros inferiores.
- Paraplegia:** paralisia completa de dois segmentos simétricos do corpo (geralmente afeta os membros inferiores).

Paresia: diminuição da força em um ou mais grupos musculares. É um grau menor de paralisia.

Parestesia: (Sinônimos – formigamento, sensações de queimadura, disestesia): sensações cutâneas subjetivas (ex.: frio, calor, formigamento, pressão, etc.), que são vivenciadas espontaneamente na ausência de estimulação.

Ponto crítico: é um local, uma prática, um procedimento ou processo em que pode-se exercer o controle sobre um ou mais fatores que, se controlados, poderiam reduzir o mínimo ou perigo.

Ponto crítico de controle: é um lugar, uma atividade ou um procedimento que não estando controlado, pode conduzir à contaminação, sobrevivência e/ou multiplicação de agentes patógenos no alimento.

Ptose palpebral: pálpebra superior pendente devido à paralisia ou desenvolvimento deficiente do músculo elevador da pálpebra.

Sinapses: junções especializadas na qual um neurônio se comunica com uma célula alvo.

Fonte: bireme.br/bvs/; EMedix - Dicionário

Anexo A – Sugestão de formulário de encaminhamento de amostras ao laboratório

Município: _____	Estado: _____
Unidade coleta da amostra: _____	
IDENTIFICAÇÃO DO SUSPEITO	
Nome: _____	
Data de nascimento: ___/___/___	Sexo: Masculino () Feminino ()
Endereço: _____	
Suspeita de botulismo: Alimentar () Ferimento () Intestinal ()	
Data do início dos sintomas: ___/___/___	
Sintomas e sintomas: _____	

MATERIAL COLETADO	
Biológico: Soro () Fezes () Outro () Especificar _____	
Bromatológico: Alimento () Especificar _____	
Embalagem () Especificar _____	
IDENTIFICAÇÃO DO ALIMENTO	
Industrializado () Artesanais/caseiro ()	
Produto: _____	
Marca: _____	Validade: ___/___/___ Lote: _____
Produtos artesanais/caseiro preparado por: _____	

Temperatura em que se encontrava o alimento coletado: _____	
Endereço local: _____	

Responsável pela coleta: _____	
Assinatura _____	
Data: ___/___/___	Hora da coleta: _____
OBSERVAÇÕES:	

Condições da amostra no recebimento pelo laboratório regional: _____

() etiqueta () preenchimento do formulário () temperatura

Condições da amostra no recebimento pelo laboratório de referência: _____

() etiqueta () preenchimento do formulário () temperatura

Anexo B – Ficha de investigação epidemiológica

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO FICHA DE INVESTIGAÇÃO BOTULISMO		Nº	
<p>CASO SUSPEITO DE BOTULISMO ALIMENTAR E/ OU POR FERIMENTOS: Paralisia flácida aguda, simétrica, descendente, com preservação do nível de consciência, caracterizado por um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: visão turva, diplopia, ptose palpebral, boca seca, disartria, disfagia ou dispnéia. A exposição a alimentos potencialmente suspeitos para presença da toxina botulínica nos últimos dez dias ou história de fermentos nos últimos 21 dias reforça a suspeita.</p> <p>CASO SUSPEITO DE BOTULISMO INTESTINAL: Criança < 1 ano com paralisia flácida aguda de evolução insidiosa e progressiva que apresente um ou mais dos seguintes sintomas: constipação, sucção fraca, disfagia, choro fraco, dificuldade de controle dos movimentos da cabeça. Adulto que apresente paralisia flácida aguda, simétrica, descendente, com preservação do nível de consciência, caracterizado por um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: visão turva, diplopia, ptose palpebral, boca seca, disartria, disfagia ou dispnéia na ausência de fontes prováveis de toxina botulínica como: alimentos contaminados, fermentos ou uso de drogas.</p> <p>NOTA: A exposição a alimentos com risco para presença de esporo de C. botulinum (ex. mel, xaropes de milho), reforça a suspeita em menores de um ano de idade.</p>					
Dados Gerais	1 Tipo de Notificação 2 - Individual		3 Data da Notificação		
	2 Agravado/doença BOTULISMO		Código (CID10) A 05.1		
	4 UF	5 Município de Notificação	Código (IBGE)		
Notificação Individual	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código	7 Data dos Primeiros Sintomas	
	8 Nome do Paciente		9 Data de Nascimento		
	10 (ou) Idade 1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano	11 Sexo M - Masculino F - Feminino 1 - Ignorado	12 Gestante 1-1º Trimestre 2-2º Trimestre 3-3º Trimestre 4 - Idade gestacional Ignorada 5-Não 6- Não se aplica 9-Ignorado	13 Raça/Cor 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9- Ignorado	
14 Escolaridade 0-Analfabeto 1-1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2-4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3-5ª a 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4-Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5-Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) 6-Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) 7-Educação superior incompleta 8-Educação superior completa 9-Ignorado 10- Não se aplica		15 Número do Cartão SUS			
16 Nome da mãe		17 UF			
Dados de Residência	18 Município de Residência		Código (IBGE)	19 Distrito	
	20 Bairro		21 Logradouro (rua, avenida,...)		
	22 Número		23 Complemento (apto., casa, ...)		
	24 Geo campo 1		25 Geo campo 2		
	26 Ponto de Referência		27 CEP		
	28 (DDD) Telefone		29 Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado		
30 País (se residente fora do Brasil)					
Dados Complementares do Caso					
Antecedentes Epidemiológicos	31 Data da Investigação		32 Ocupação		
	33 Data do 1º Atendimento		34 Nº Total de Atendimentos até a Suspeição Clínica		
	35 Data da Suspeição Clínica		36 Ocorreu Hospitalização 1-Sim 2-Não 9-Ignorado		
	37 Data da Internação		38 Data da Alta Hospitalar		
	39 UF	40 Município do Hospital	Código (IBGE)	41 Nome do Hospital	
Dados Clínicos	42 Sinais e Sintomas 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		43 Exame Neurológico 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		
	<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Visão Turva	<input type="checkbox"/> Flacidez de Pescoço	<input type="checkbox"/> Ptose Palpebral	<input type="checkbox"/> Fraqueza em Membros Sup.
	<input type="checkbox"/> Náusea	<input type="checkbox"/> Diplopia	<input type="checkbox"/> Dispnéia	<input type="checkbox"/> Oftalmoparesia / Oftalmoplegia	<input type="checkbox"/> Fraqueza em Membros Inf.
<input type="checkbox"/> Vômito	<input type="checkbox"/> Disartria	<input type="checkbox"/> Insuficiência Respiratória	<input type="checkbox"/> Midríase	<input type="checkbox"/> Fraqueza Descendente	
<input type="checkbox"/> Diarréia	<input type="checkbox"/> Disfonia	<input type="checkbox"/> Insuficiência Cardíaca	<input type="checkbox"/> Paralisia Facial	<input type="checkbox"/> Fraqueza Simétrica	
<input type="checkbox"/> Constipação	<input type="checkbox"/> Disfagia	<input type="checkbox"/> Coma	<input type="checkbox"/> Comprometimento da Musculatura Bulbar	<input type="checkbox"/> Alterações de Sensibilidade	
<input type="checkbox"/> Cefaléia	<input type="checkbox"/> Boca Seca	<input type="checkbox"/> Parestesia, onde: _____			
<input type="checkbox"/> Tontura	<input type="checkbox"/> Ferimento	<input type="checkbox"/> Outros _____			
44 Reflexos Neurológicos		1 - Normais 2 - Aumentados 3 - Reduzidos/Ausentes 9 - Ignorado			

Fonte de Transmissão

45 Suspeita de Transmissão Alimentar? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado

46 Se Sim, qual Alimento Suspeito

47 Produção do Alimento Suspeito Industrial/Comercial Caseira

48 Se Industrial/Comercial, Especificar: Marca, Data de Validade e Lote

49 Exposição ao Alimento 1 - Única 2 - Múltipla 9 - Ignorado

50 Se Única, tempo decorrido entre ingestão e início dos sintomas _____ Horas

51 Se Múltipla, tempo decorrido entre a primeira ingestão e o início dos sintomas _____ Horas

52 Se Múltipla, tempo decorrido entre a última ingestão e o início dos sintomas _____ Horas

53 Local da Ingestão Domicílio Creche/Escola Trabalho Restaurante/Bar/Lanchonete Festa Outro: _____

54 UF 55 Município onde Ingeriu o Alimento suspeito Código (IBGE) _____

56 Número de Pessoas (comensais) que Consumiram o Alimento Suspeito _____

Tratamento

57 Tratamento Assistência Ventilatória Antibioticoterapia Soro Antibotulínico Outro _____

58 Se Recebeu Soro Antitoxinotípico, Data da Administração _____

59 Se Recebeu Soro Antitoxinotípico, foi após a Coleta de Material Clínico? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado

Dados do Laboratório

60 Pesquisa de Toxina Botulínica

Material	Coletou Material? 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	Data da Coleta	Resultado 1- Presença de toxina 2- Ausência de toxina 3- Inconclusivo 4- Não Realizado	Tipo de Toxina (1-A, 2-B, 3-AB, 4-E, 5-F, 6-G, 7-Outra, 9-Ign)
Soro	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	
Fezes	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	
Alimento 1: _____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	
Alimento 2: _____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	
Outros: _____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	

Exames Complementares

61 Líquor 1 - Realizado 2 - Não Realizado

62 Data da Coleta _____

63 Número de células / mm³ _____

64 Proteínas mg% _____

Eletroneuromiografia

65 Eletroneuromiografia 1 - Realizada 2 - Não Realizada

66 Data da Realização _____

67 Neurocondução Sensitiva 1 - Normal 2 - Diminuição de Amplitude 3 - Lentificações

68 Neurocondução Motora 1 - Normal 2 - Diminuição de Amplitude 3 - Lentificações

69 Estimulação Repetitiva 1 - Normal 2 - Decremento (freq baixa) 3 - Incremento (freq alta)

Conclusão

70 Classificação Final 1 - Confirmado 2 - Descartado (especificar outro agente)

71 Critério de Confirmação / Descarte 1 - Laboratorial 2 - Clínico-Epidemiológico

72 Forma de Botulismo 1 - Alimentar 2 - Intestinal 3 - Por ferimento 4 - Outra

73 Presença de Toxina Botulínica na Amostra: Clínica Bromatológica

74 Tipo de Toxina Isolada na Amostra Clínica Bromatológica

75 Qual a causa / Alimento Incriminado / Alimento Potencialmente Suspeito

76 Doença Relacionada ao Trabalho 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado

77 Evolução do Caso 1 - Cura 2 - Óbito por botulismo 3 - Óbito por outras causas 9 - Ignorado

78 Data do Óbito _____

79 Data do Encerramento _____

Informações complementares e observações

Descrever alimentos potencialmente suspeitos para botulismo, ingeridos nos últimos 10 dias anteriores ao início dos sintomas

Tipo de Alimento _____ Local de Consumo _____

Observações Adicionais

Investigador

Município/Unidade de Saúde _____ Cód. da Unid. de Saúde _____

Nome _____ Função _____ Assinatura _____

Anexo C – Tecnologias mais indicadas para o controle de toxina botulínica em alimentos

A aplicação correta de métodos, visando proteger a saúde do consumidor, prevenindo assim o surgimento de alterações indesejáveis no alimento, causadas pela presença de microorganismos deteriorantes e/ou patogênicos, baseia-se no controle de alguns fatores que interferem no metabolismo dos microorganismos.

Os microorganismos deteriorantes são responsáveis pela alteração e perda de alimentos. Os microorganismos patogênicos, de maior interesse à saúde pública, podem causar danos aos seres vivos. Uma vez que se torna praticamente impossível que os microorganismos indesejáveis tenham acesso aos alimentos, faz-se necessária a adoção de medidas para controlar o seu desenvolvimento.

A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dos microorganismos nos alimentos depende de fatores que estão relacionados com as características próprias dos alimentos (fatores intrínsecos) e os relacionados com o ambiente onde o alimento se encontra (fatores extrínsecos). Os principais fatores intrínsecos são: pH, atividades de água (A_w), composição de alimentos e competição entre a microbiota presente. Os extrínsecos são: temperatura, umidade relativa do ambiente. A adição de aditivos capazes de controlar a produção de toxina botulínica, por meio da inibição da germinação de esporos e da multiplicação do *Clostridium botulinum*, é prática importante na produção de alimentos mais comumente envolvidos na veiculação da doença.

FATORES INTRÍNSECOS

pH

Quando um ácido, sal ou base é dissolvido em água, suas moléculas se decompõem em íons, que são carregadas de eletricidade. A quantidade de íons de hidrogênio disponível determina a atividade de pH da solução.

Os microorganismos têm valores de pH mínimos, ótimos e máximos para sua multiplicação. A maioria dos microorganismos desenvolve-se melhor em pH ao redor do neutro (6,5-7,5), alguns em pH ácido (abaixo de 4,5), que são denominados de “acidófilos”, e outros em pH básico, os “basófilos”.

Alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,5$) como leite, carnes, pescados e alguns vegetais estão mais sujeitos à multiplicação microbiana, tanto de espécies patogênicas quanto de espécies deteriorantes. Já nos alimentos ácidos (pH entre 4,0 e 4,5), há predominância de crescimento de leveduras, bolores e bactérias esporuladas. Nos alimentos muito ácidos ($\text{pH} < 4,0$), a microflora capaz de se desenvolver é restrita apenas aos bolores, leveduras, bactérias lácticas e acéticas.

O quadro 1 apresenta valores aproximados de pH de alguns alimentos. A indústria utiliza, por exemplo, acidulantes como o ácido cítrico, láctico, acético que são adicionados com o objetivo de baixar o pH, aumentar a acidez e, com isso, minimizar o risco de desenvolvimento de microorganismos indesejáveis.

Quadro 1. Valores aproximados de pH de alguns produtos alimentícios

Produto	pH
Carne bovina	5,1 – 6,2
Carne frango	6,2 – 6,4
Leite	6,3 – 6,5
Cenoura	4,9 – 6,0
Tomate	4,2 – 4,3
Suco de laranja	3,6 – 4,3
Maçã	2,9 – 3,3

Fonte: JAY – 1992

Atividade de água (Aw) ou atividade aquosa (Aa)

É a quantidade de água livre presente nos alimentos que pode favorecer o metabolismo dos microorganismos.

Aw = 1,00 – Significa água pura

Aw = 0,99 – Já existe um mínimo de nutrientes

Aw = 0,60 – Não existe mais água livre que favoreça o metabolismo das bactérias, mas certos fungos podem se reproduzir

Os microorganismos não se multiplicam em água pura. A possibilidade de alteração do alimento por microorganismos cessa em alimentos com Aw abaixo de 0,60. É importante ressaltar que a Aw está relacionada com moléculas de água quimicamente disponíveis. A molécula de água quimicamente ligada, por exemplo, em solução saturada de cloreto de sódio não está disponível para a grande maioria dos microorganismos. A adição de açúcar também causa alteração na atividade de água. A atividade de água de um alimento também pode ser reduzida por meio da remoção de água (desidratação) e do congelamento.

Os microorganismos que podem se desenvolver em meios relativamente secos, são denominados de “xerofílicos”. Os “halofílicos” desenvolve-se em produtos com concentração elevadas de sal, em especial o NaCl e os “osmofílicos” em concentrações elevadas de açúcar.

O quadro 2 apresenta valores de Aw de alguns alimentos. Verifica-se que, na maioria dos alimentos frescos, a Aw é superior a 0,95.

Quadro 2. Valores Aw de alguns alimentos

Valores Aw	Alimentos
> 0,98	Aves e pescado fresco
> 0,97	Frutas frescas e vegetais
> 0,95	Carnes frescas carnes frescas
0,97	Ovos
0,095 a 0,96	Pão
0,75 a 0,080	Geléia

Fonte: BANWART – 1989

Composição de alimentos

Os microorganismos utilizam diferentes substratos que compõem os alimentos, como nutrientes, para se desenvolverem. Metabolizam os carboidratos a fim de obter energia para o seu desenvolvimento. Nos alimentos ricos em proteínas, os microorganismos aproveitam as moléculas menores (peptídios) como substrato. Grande número de microorganismos não possui a capacidade de multiplicar-se em óleos e gorduras puras.

O quadro 3 indica valores mínimos, ótimos e máximos de temperatura, pH e atividade de água na multiplicação de alguns patógenos que contaminam os alimentos.

Quadro 3. Fatores ótimos e limitantes que influenciam os patógenos de origem alimentar mais comuns

Microorganismos	Fatores que afetam a multiplicação						
	Temperatura			PH			Aw *
	Mínima	Ótima	Máxima	Mínima	Ótima	Máxima	Mínimo
<i>Bacillus cereus</i>	5	30	50	4,4	7,0	9,3	0,93
<i>Campylobacter jejuni</i>	25	42	45	4,9	7,0	9,0	0,98
<i>Clostridium botulinum A e B</i>	10	37	50	4,8	7,0	8,5	0,95
<i>Clostridium botulinum E</i>	03	30	45	5,0	7,0	8,5	0,97
<i>Clostridium perfringens</i>	15	46	50	5,0	7,0	8,9	0,96
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	37	44	4,5	7,0	8,0	**
<i>Salmonella sp</i>	6	43	46	3,8	7,0	9,0	0,95
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	37	48	4,3	7,0	9,0	0,83
<i>Vibrio cholerae</i>	5	37	44	6,0	7,0	11,0	0,97
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	37	44	4,8	8,0	9,0	0,93
<i>Vibrio vulnificus</i>	8	37	43	5,0	8,0	9,0	0,93
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3	30	43	4,4	7,0	9,0	0,97

Fonte: IAMFES, 1991

* Atividade de água

** Não há dados publicados

FATORES EXTRÍNSECOS

Temperatura

É um dos fatores ambientais que mais afetam a viabilidade e multiplicação dos microorganismos. Estes podem se desenvolver numa faixa bastante ampla de temperatura. Cada tipo de microorganismo possui características estruturais e metabólicas próprias, oferecendo condições específicas de resistência ao calor e ao tempo de exposição.

A maioria dos patógenos são “mesófilos” e desenvolvem-se em temperatura entre 0,5 e 50°C. Os do grupo dos “psicotrófilos” desenvolvem-se em temperaturas baixas entre 0 e 0,7°C e são os de maior resistência térmica, enquanto os “termófilos” desenvolvem-se em temperaturas entre 35 e 90°C e apresentam resistência térmica acentuada. Os microorganismos psicotróficos multiplicam-se bem em alimentos refrigerados. Os mesófilos correspondem à grande maioria de importância em alimentos e os termófilos importantes pertencem ao gênero *Bacillus* e *Clostridium*.

O controle da temperatura lidera a lista dos métodos de preservação dos alimentos e, para utilizá-lo, devemos conhecer:

- temperatura ideal e limitante de cada microorganismo patogênico;
- resistência de cada microorganismo frente a várias temperaturas;
- tempo necessário de exposição para destruir os microorganismos patogênicos em cada temperatura;
- quantidade estimada de cada microorganismo patogênico nos alimentos;
- estrutura dos alimentos: Aw, pH e teor de nutrientes para avaliar o poder de penetração do calor e possíveis alterações sensoriais;
- características do meio, onde o alimento se encontra após o tratamento.

Umidade relativa do ambiente

A umidade relativa mantém estrita relação com a atividade de água (Aw). Produtos com baixa atividade de água devem ser protegidos em ambientes onde a umidade relativa é elevada, caso contrário sua superfície poderá ser hidratada, ocorrendo mudança da quantidade de água disponível, favorecendo o desenvolvimento de microorganismos.

O binômio umidade relativa X temperatura deve ser considerado: quanto maior a temperatura de estocagem, menor deverá ser a umidade relativa, sendo o inverso verdadeiro.

ADITIVAÇÃO

O nitrito tem sido usado desde longo tempo para inibir o desenvolvimento e produção de toxina botulínica. Sua eficácia depende da interação complexa com os outros fatores (pH, Aw, tempera-

tura). Entretanto, o risco de carcinogênese e teratogênese das nitrosaminas impulsionou a pesquisa de alternativas para a redução de sua concentração ou supressão de uso.

O ácido sórbico e seus sais são capazes de retardar o desenvolvimento e produção de toxina em produtos cárneos, observando que sua ação aumenta à medida que o pH diminui, pois o efeito inibidor depende da concentração de ácido não dissociado.

A adição de ácido ascórbico permite a redução de uso do nitrito. Verificou-se que óleos essenciais (alho, pimenta preta, cravo, orégano) e extratos alcoólicos (alho, rosmaninho) de várias plantas aromáticas podem inibir a germinação de esporos e o desenvolvimento vegetativo do *C. botulinum*, inibindo assim, a produção de toxina.

A adição de bactérias ácido lácticas ou de extratos de seus metabólitos podem diminuir o pH do alimento tanto por transformação de carboidratos em ácidos orgânicos, em especial o ácido láctico, ou através da produção de metabólitos como dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, anidrido carbônico e bacteriocinas.

A nisina, um biopreservativo usado em vegetais e queijos, tem efeito antibotulínico indireto. A adição de lisozima também é uma proposta para o controle da doença botulínica, porém foi demonstrado que esta enzima aumenta a possibilidade de desenvolvimento de cepas não proteolíticas do *C. botulinum*.

Anexo D – Detecção da toxina botulínica em laboratório

A detecção da presença da toxina botulínica pode ser realizada por bioensaio em camundongo ou por outros métodos, como o de ELISA. O bioensaio é o método de referência, considerado o mais indicado.

A presença e a quantificação da toxina são realizadas no soro sanguíneo do caso suspeito ou do material obtido por extração de amostras ou ainda do sobrenadante de cultura. O soro não necessita de nenhum tratamento, ao contrário das demais amostras.

1. Extração da toxina de amostras de lavado gástrico, conteúdo intestinal, vômito, alimentos, embalagens vazias e outras, exceção do sobrenadante da cultura

A extração é feita por homogeneização de amostras sólidas, ou mistura das semi-sólidas, e líquidas em solução de gel fosfato. A proporção é de uma parte da amostra para a mesma parte de gel fosfato (Ex.: 10g da amostra em 10ml de gel fosfato). Recomenda-se que tanto a amostra como o gel fosfato estejam em temperatura de refrigeração e que o procedimento de homogeneização ou mistura seja rápido para evitar desnaturação da toxina por exposição excessiva ao calor e à temperatura ambiente. No caso de embalagem vazia, promover o enxágüe das paredes internas com gel fosfato. Deixar as amostras em contato com a solução de gel fosfato por uma noite, em refrigerador. Na manhã seguinte, promover a centrifugação refrigerada das amostras homogeneizadas ou misturadas e, para a embalagem vazia, recolher o gel fosfato em tubo estéril.

2 Obtenção do sobrenadante de cultura

Após a cultura em caldo, conforme descrito adiante, centrifugar a 2.500-3000rpm, em centrifuga refrigerada. Separar o sobrenadante em tubo estéril.

3 Tratamento das amostras

Tratar as amostras obtidas por extração com gel fosfato e por centrifugação do caldo de cultura, conforme já especificado. As amostras obtidas, conforme explicitado no item 1, serão divididas em três porções para:

- uma fração não sofrerá nenhum tratamento e será usada para inoculação direta;
- uma fração será aquecida a 80°C durante 15 minutos para inativar possível toxina botulínica presente na amostra;
- uma fração será tratada com solução de tripsina para determinar possível presença de pró-toxina na amostra. Para tanto, adiciona-se a solução e mantém-se a 35-37° C por uma hora.

A tripsinização é necessária, pois em amostras como lavado gástrico, fezes e alimento pode estar presente a pró-toxina, que será transformada em toxina pela ação de uma protease, como a

tripsina. Cepas de *C. botulinum*, capazes de produzir proteases, (proteolíticas) transformam a pró-toxina em toxina ativa no próprio alimento (Tipo A e alguns do Tipo B). Amostras de soro e de conteúdo intestinal sempre apresentam a toxina ativa, pois a ação da tripsina já ocorreu *in vivo*.

4 Inoculação da amostra para a caracterização presuntiva de toxina botulínica

As amostras que serão usadas para inoculação são: soro do caso suspeito e as amostras obtidas conforme descrito em 1, 2 e 3.

O animal usado para o bioensaio é camundongo albino com 20 a no máximo 25g de peso corpóreo. De preferência usar camundongos fêmeas. Separar dois camundongos por amostra a ser inoculada e dois camundongos controle (não inoculados). A via de inoculação é o peritônio (inoculação intraperitoneal).

A quantidade de amostra necessária por animal é de 0,5ml, que é inoculada por meio de seringa e agulha tipo insulina. Deve-se usar pelo menos dois animais para cada amostra. A contenção do animal pode ser feita pelo próprio aplicador ou por um auxiliar, observando-se que o animal deve permanecer esticado, com a cabeça e a cauda contida. A pata do animal também deve estar distendida e segura para facilitar a inoculação e assegurar que a inoculação não atinja nenhum órgão (em especial os intestinos e pulmões).

Os camundongos inoculados devem estar em caixas especiais e devem permanecer sem água e comida por pelo menos 2 horas. A observação da reação dos animais deve ser seguida de forma contínua nas primeiras 6 horas e a cada 3 a 4 horas, por até 72 horas. Quando da presença da toxina botulínica ativa, o animal desenvolverá os seguintes sinais: pêlo eriçado, dificuldade de respiração (respiração em fole), paralisia das patas traseiras, acinturamento (diafragma em contração) e morte. É importante manter os controles. Por “stress” de transporte e do novo ambiente, os animais de laboratório podem apresentar alterações de comportamento e de metabolismo, que não estão relacionados com as inoculações. Os controles, mesmo não tendo sido inoculados, também serão sacrificados. Para interpretação dos resultados, consultar o quadro a seguir.

Tabela de interpretação dos resultados laboratoriais

Amostra	Tratamento laboratorial da amostra	Observações do bioensaio em camundongo relacionadas aos camundongos	Diagnóstico laboratorial
Soro	Nenhum	Sem sintomas característicos e vivos após 72h da inoculação.	Negativo
Soro	Nenhum	Inoculados com fração sem tratamento, com sintomas característicos e morte, após no máximo 72h da inoculação.	Presuntivo positivo
Soro	Adicionado de mistura (<i>pool</i>) de antitoxinas*	Sem sintomas característicos e vivos após 72h da inoculação.	Positivo (presença de pelo menos um tipo de toxina botulínica)
Soro	Nenhum	Inoculados com outros sintomas não característicos, vivos ou mortos após 72h da inoculação.	Negativo
Conteúdo intestinal	Extrato com gel fosfato, frações aquecida e não.	Sem sintomas característicos e vivos após 72h da inoculação.	Negativo
Conteúdo intestinal	Extrato com gel fosfato, frações aquecida e não.	Com sintomas característicos e mortos na fração não aquecida e animais sem sintomas e vivos na fração aquecida, após no máximo 72h da inoculação.	Presuntivo positivo
Conteúdo intestinal	Extrato com gel fosfato, adicionado de mistura (“pool”) de antitoxinas*	Animais sem sintomas característicos e vivos após 72h da inoculação.	Positivo (presença de pelo menos um tipo de toxina botulínica)
Conteúdo intestinal	Extrato com gel fosfato, frações aquecida e não aquecida.	Todos os animais inoculados mortos, inclusive pela fração aquecida até 72h da inoculação (substância tóxica não inativada pelo calor).	Negativo

Conteúdo intestinal	Extrato com gel fosfato, frações aquecida e não aquecida.	Animais com outros sintomas, não característicos, vivos ou mortos após 72h da inoculação.	Negativo
Outros (lavado gástrico, alimento)	Extrato com gel fosfato, frações aquecida, não aquecida e tripsinizada	Animais inoculados sem sintomas característicos e vivos após 72h da inoculação.	Negativo
Outros	Extrato com gel fosfato, frações aquecida, não aquecida e tripsinizada.	Animais inoculados com a fração não aquecida ou tripsinizada com sintomas característicos e os inoculados com a fração aquecida sem sintomas e vivos após 72h da inoculação.	Presuntivo positivo
Outros	Extrato com gel fosfato, fração adicionada de mistura (<i>pool</i>) de antitoxinas*	Animais inoculados sem sintomas e vivos após 72h da inoculação.	Positivo (presença de pelo menos um tipo de toxina botulínica)
Outros	Extrato com gel fosfato, frações aquecida, não aquecida e tripsinizada.	Todos os animais inoculados mortos após 72h da inoculação, inclusive pela fração aquecida (substância tóxica não inativada pelo calor).	Negativo
Outros	Extrato com gel fosfato, frações aquecida, não aquecida e tripsinizada	Animais inoculados com outros sintomas, não característicos, vivos ou mortos após 72h da inoculação.	Negativo

* Pool de antitoxinas = anti A, B, C, D, E, F

5 Caracterização do tipo de toxina presente na amostra

O diagnóstico laboratorial específico é realizado nas amostras presuntivas positivas e tem importância diagnóstica epidemiológica, pois permite caracterizar a toxina responsável pelo caso de botulismo.

76

As amostras que forem positivas para o ensaio presuntivo serão usadas para nova inoculação, com a finalidade de caracterizar o tipo de toxina presente. Pode ser tanto uma tripsinizada como uma não tripsinizada, nunca a aquecida (lembrando que a toxina botulínica é termolábil e que, na amostra aquecida, estará inativada). Para tanto, separar 1,0-1,25ml da amostra que deu resultado presuntivo positivo e acrescentar 0,25-0,30 ml de antisoro purificado para fins analíticos (separadamente para an-

tisoro polivalente e cada um dos específicos). Incubar a mistura a 35 - 37°C por 30 minutos. Inocular em pelo menos dois camundongos (0,5ml via intraperitoneal), conforme descrito acima.

Para a caracterização completa da presença de toxina botulínica, é necessário realizar testes após a inativação do material obtido pela extração, com antisoros específicos. No caso do soro a inativação é feita diretamente. No caso das outras amostras, considerar a necessidade de tripsinizar o material. Para inativação, separe porções em tubos estéreis do material, acrescentando os antisoros específicos, conforme quadro 1 Interpretar com o auxílio do quadro 2.

Quadro 1. Volume de amostras e antitoxina para caracterização do tipo de toxina botulínica

Soro		Extratos e culturas não tripsinizadas		Extratos e culturas tripsinizadas	
Volume da amostra	Volume de antitoxina	Volume da amostra	Volume de antitoxina	Volume da amostra	Volume de antitoxina
1,2 mL	0,3 mL (anti A)	1,0 mL	0,25 mL (anti A)	1,25 mL	0,25 mL (anti A)
1,2 mL	0,3 mL (anti B)	1,0 mL	0,25 mL (anti B)	1,25 mL	0,25 mL (anti B)
1,2 mL	0,3 mL (anti E)	1,0 mL	0,25 mL (anti E)	1,25 mL	0,25 mL (anti E)
1,2 mL	0,3 mL (anti F)	1,0 mL	0,25 mL (anti F)	1,25 mL	0,25 mL (anti F)
1,2 mL	0,3 mL (polivalente*)	1,0 mL	0,25 mL (polivalente)	1,25 mL	0,25 mL (polivalente)

* Polivalente = anti-A, B, C, D, E, F

Obs: A toxina A e algumas B, são produzidas por cepas proteolíticas. A toxina E e algumas B, são produzidas por cepas não proteolíticas. Caso não disponha de todas as antitoxinas, faça o teste só com o antisoro polivalente..

Quadro 2. Caracterização do tipo de toxina botulínica

Amostra adicionada de antitoxina	Observações	Resultado
Soro, frações de outras amostras ou sobrenadante de cultura adicionadas com antitoxina A, B, E e F (isoladamente).	Animais sem sintomas e vivos (a antitoxina específica inativou a toxina presente e os protegeu). Animais com sintomas característicos e mortos após, no máximo, 72h da inoculação (inoculado com antitoxinas não específicas, incapazes de inativar a toxina presente).	Positivo para a antitoxina específica, que protegeu a vida dos animais inoculados.

6 Interpretação dos resultados laboratoriais da determinação de toxina

O resultado obtido pode estar restrito ao diagnóstico presuntivo ou incluir o específico com a determinação da toxina responsável pela doença. O diagnóstico presuntivo associado aos sinais e sintomas do caso suspeito, permite caracterizar clinicamente a doença botulínica, mas não é sufi-

ciente para a caracterização epidemiológica do surto, uma vez que não determina o tipo da toxina presente. O resultado laboratorial negativo não descarta a suspeita clínica.

7 Detecção do *Clostridium botulinum*

O isolamento da bactéria e do seu esporo sem a presença da toxina botulínica, tanto no material biológico coletado do suspeito como nos alimentos, não é diagnóstico de botulismo. A exceção se refere a casos de botulismo intestinal e de suspeita de botulismo por fermento, quando a cultura do conteúdo intestinal (fezes) ou do exsudato profundo do fermento, respectivamente, revelarem a predominância ou a presença única de cepa desta bactéria, com a evidência laboratorial da sua capacidade de produzir toxina.

Como avaliação de risco potencial ou de possíveis fontes alimentares do botulismo intestinal em menores seis meses (a rigor e de acordo com os dados da literatura, em menores de três meses de idade), em especial na análise de mel usado para adoçar alimentos para bebês, a cultura deste agente bacteriano pode ser de interesse para caracterizar possíveis veículos e a ocorrência da doença.

A caracterização do gênero e espécie deve ser complementada com a evidência de produção de toxina a partir da cepa isolada, para o dimensionamento do risco potencial, pois existem cepas não capazes de produzir toxina ou que produzem toxina que não afetam o homem, como os tipos C1, C2 e D.

7.1 Metodologia convencional

As etapas para determinação laboratorial destas amostras podem ser realizadas conforme segue:

- Semeadura das amostras em meio líquido, como o Meio de Carne Cozida (“Cooked Meat Medium”). O tratamento térmico da suspensão da amostra a 70-80°C por 10 minutos permite inativar as formas vegetativas e outras bactérias não formadoras de esporos que possam estar presente nas amostras. Somente realizar o tratamento térmico quando houver segurança da presença de formas esporuladas, que podem ser observadas por preparação de lâmina, coloração pelo Gram ou pelo verde malaquita e a observação em microscópio óptico por imersão;
- incubação a 30-35°C por até 5 dias;
- centrifugação refrigerada da cultura;
- inoculação do sobrenadante em animais de experimentação, para verificar presença de toxina na cultura.

Caso seja positivo para toxina, o material da cultura pode ser plaqueado em meio sólido, como o Agar Gema de Ovo (*Egg Yolk Agar*) que permite verificar as reações de lipase e lecitinase e permite o isolamento de colônias.

Caso seja necessária a quantificação de esporos (em especial para o botulismo infantil/intestinal e por fermento), pode-se proceder à técnica do Número Mais Provável (NMP), usando o meio de carne cozida.

7.2 Metodologia alternativa

A amplificação do DNA, por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR), pode detectar a presença do microrganismo na amostra analisada (alimentos, amostras clínicas, meio ambiente). Porém apesar da PCR ser um método rápido, sensível e específico, é importante ressaltar que o resultado confirma a presença do organismo, mas não evidencia a viabilidade da bactéria, ou seja, se a toxina está ou não sendo produzida. O enriquecimento prévio da amostra é então necessário para demonstrar a presença do microrganismo viável. A aplicação de PCR é útil no rastreamento do microrganismo em amostras de alimentos.

Anexo E – Manual de biossegurança para manipulação de *Clostridium botulinum* e sua toxina

1 INTRODUÇÃO

A contaminação por *Clostridium botulinum* por manipulação do agente ou toxina em laboratório é raro (STERNE; WERTZEL, 1950). Contudo as intoxicações por este microorganismo devem ser consideradas bastante severas, pois existe a possibilidade de contaminação por meio de produtos alimentícios, materiais clínicos (soro, fezes) e amostras ambientais (terra, águas superficiais).

A utilização da toxina em laboratórios de contenção primária é extremamente arriscada, pois esta pode ser absorvida depois da ingestão ou contato com a pele, olhos, ou membranas mucosas, inclusive respiratórias (HOLZER, 1962). As culturas de crescimento em condições ótimas podem produzir até 2×10^6 DL₅₀ por mL para ratos. Dessa forma, é recomendada a contenção de níveis de biossegurança 2, associados com equipamentos de contenção para todas as atividades com materiais conhecidos ou contendo a toxina em potencial.

2 NORMAS DE BIOSSEGURANÇA

2.1 Normas para laboratório de pesquisa e diagnóstico

2.1.1 Proteção individual

- lavar as mãos ao entrar e sempre após a manipulação de amostras, ou antes de deixar o laboratório;
- para entrar nos laboratórios, o profissional deve utilizar-se de roupas protetoras, tais como uniformes (calça e jaleco) ou avental abotoado, não utilizando as mesmas em áreas externas;
- nunca usar lentes de contato no laboratório, pois diminuem a limpeza natural dos olhos. Além disso, dificultam a limpeza dos olhos em caso de contato com material potencialmente perigoso. Caso seja necessária a sua utilização, é obrigatório o uso de óculos de proteção;
- é fundamental ao pessoal do laboratório manter os cabelos presos durante a jornada de trabalho, utilizando touca protetora;
- não participar das atividades práticas de risco, se portador de ferimentos nas mãos, e, se possível, proteger qualquer tipo de ferimento exposto;
- não tocar os olhos, boca ou nariz com as mãos, durante o trabalho;
- não umedecer etiquetas com a língua;
- usar máscaras para proteção das faces ou bancadas com escudo leve de material plástico leve e transparente;

- não fazer uso de lenços pessoais, aventais ou jalecos para limpar as mãos, objetos ou instrumentos de trabalhos no laboratório;
- é proibido pipetar com a boca. Para fins de pipetagem, utilizar dispositivos auxiliares, tais como pêras de borracha, pipetadores automáticos;
- é proibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos, usar jóias (anéis, pulseiras, relógios, etc.) e armazenar alimentos no laboratório;
- trabalhar sempre de maneira ordenada, tranqüila e metódica, evitando movimentos desnecessários. Traçar um plano de trabalho, considerando o tempo necessário para análise e leitura;
- é proibido o manuseio de maçanetas, telefones, puxadores de armários ou outros objetos de uso comum ao usar luvas durante atividades em que agentes tóxicos infecciosos e correlatos estiverem sendo manipulados;
- extrema precaução deve ser tomada quando forem manuseadas agulhas e seringas de modo a evitar a auto-inoculação e a produção de aerossóis durante o uso e o descarte;
- as agulhas não devem ser entortadas, quebradas, recapeadas ou removidas da seringa após o uso. Agulha e seringa devem ser imediatamente colocadas em recipiente resistente à prova de perfurações e descontaminados, preferencialmente autoclavados antes do descarte. Desaconselha-se a reutilização de seringas;
- um manual de biossegurança deve ser preparado de acordo com as especificidades das atividades realizadas. Todo o pessoal deve ser orientado sobre os possíveis riscos e para a necessidade de seguir as especificações de cada rotina de trabalho, procedimentos de biossegurança e práticas estabelecidas no manual;
- Pessoas com atividade na manipulação do microorganismo ou toxina deverão estar previamente imunizadas, com toxóide botulínico. Esta vacina é um toxóide polivalente, destinado ao pessoal de laboratório que trabalham regularmente com toxinas botulínicas para testes laboratoriais;
- Deve se ter a relação de centros ou hospitais onde estarão à disposição as antitoxinas para casos de contaminação e intoxicação.

2.1.2 Equipamentos de proteção coletiva

a) Cabines de segurança biológica

Devem ser utilizadas cabines de segurança biológica (Classe II), que é uma cabine de contenção máxima, sempre que:

- sejam realizados procedimentos com elevado potencial de criação de aerossóis, como centrifugação, trituração, homogeneização, agitação vigorosa, ruptura por sonicação, abertura de recipientes, contendo material onde a pressão interna possa ser diferente da pressão ambiental, inoculação intranasal em animais e em cultura de tecidos infectados;
- altas concentrações ou grandes volumes de organismos. Tais materiais só poderão ser centrifugados fora de cabines de segurança, se forem utilizadas centrífugas de segurança e frascos lacrados. Estes só deverão ser abertos no interior da cabine de segurança biológica.

b) Chuveiros de emergência

O chuveiro de emergência deve ser utilizado em casos de exposição ou contaminação por reagentes químicos e materiais biológicos sobre o corpo. As áreas dos Chuveiros de Emergência deverão estar sempre desimpedidas para o uso imediato quando necessário. Deverá ser feita periodicamente a revisão dos mesmos e registradas em protocolos para este fim.

c) Lava olhos

O lava olhos deve ser utilizado em casos de exposição ou contaminação dos olhos por reagentes químicos ou materiais biológicos nos olhos. A área dos lava olhos deve estar sempre desimpedida para o uso imediato quando necessário. Deverá ser feita periodicamente a revisão dos mesmos e registradas em protocolos para este fim.

d) Extintores de incêndio

Devem estar identificados quanto a sua classe: “A” para combustíveis sólidos, “B” para líquidos inflamáveis e “C” para material elétrico. Devem estar classificados quanto à sua utilização: Gás Carbônico (CO₂); Pó Químico Seco e Carga d’água. O pessoal que trabalha no laboratório deverá estar treinado quanto à sua utilização, pois a má utilização dessas substâncias pode acarretar em aumento da formação de aerossóis e, conseqüentemente, no aumento da contaminação ambiental. Deverá ser feita periodicamente a revisão dos mesmos quanto à possibilidade de vazamento e troca, quando expirados os prazos de validade.

2.1.3 Procedimentos para a proteção do ambiente de trabalho

O responsável legal tem a responsabilidade de limitar o acesso ao laboratório. Cabe a ele a responsabilidade de avaliar cada situação e autorizar quem poderá entrar ou trabalhar no laboratório.

O responsável legal deve estabelecer políticas e procedimentos com ampla informação a todos que trabalhem no laboratório sobre o potencial de risco relacionado ao trabalho, bem como sobre os requisitos específicos para entrada em laboratório e em salas onde ocorra manipulação de microorganismos e toxinas.

- o acesso ao laboratório é limitado ou restrito às pessoas que nele trabalham;

- as portas do laboratório devem conter sinais indicativos do grau de risco dos agentes manipulados;
- identificar as amostras antes de iniciar a análise e, em geral, não descartar até obter os resultados;
- a bancada de trabalho deve ser limpa sempre após a manipulação de agentes biológicos;
- o laboratório deve ser mantido limpo e livre da presença de animais, plantas e objetos não relacionados com as atividades realizadas;
- o descarte de vidraria quebrada deve ser feito em caixas de papelão, identificadas e forradas com sacos plásticos, evitando riscos ao ambiente e operadores;
- todo lixo de laboratório deve ser adequadamente descontaminado antes de ser descartado;
- agulhas e seringas hipodérmicas devem ser usadas somente para inoculação parenteral e para aspiração de fluidos de animais de laboratório e de garrafas de diafragmas;
- derramamentos ou acidentes que resultem em exposição a organismos devem ser imediatamente notificados ao responsável legal, com providências de avaliação médica, vigilância e tratamento, sendo mantido registro dos acidentes e das providências adotadas.

2.1.4 Procedimentos para a proteção do meio ambiente

- observar se a substância a ser descartada não provoca risco ao homem, animais e ao meio ambiente;
- os resíduos comuns devem ser acondicionados em sacos plásticos para lixo, retirados duas vezes ao dia e colocados nos contêineres de coleta seletiva;
- os materiais contaminados nunca devem ser escoados na pia. O material contaminado deve ser autoclavado (121°C x 30 minutos) antes de ser descartado.

2.1.5 Práticas de emergência

- ao se contaminar no laboratório, o funcionário deverá tomar banho com quantidade abundante de água e sabão durante pelo menos 10 minutos. Se possível utilizar soluções de iodo de povidone (como Povidini®);
- deve-se lavar os olhos ou as membranas mucosas durante pelo menos 15 minutos com solução salina ou água;
- notificar imediatamente ao responsável legal ou superior mediato;
- caso seja necessário solicitar socorro para remoção do acidentado, não existe a possibilidade de transmissão nosocomial do botulismo;

- em caso de derramamento de microorganismo, este é susceptível a muitos desinfetantes, mas os mais recomendados são: hipoclorito de sódio 1% ou etanol 70%. Em caso de derramamento de toxina, esta é inativada ao tratamento com hipoclorito de sódio 0,1% ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N;
- a toxina é destruída a 100°C por 10 minutos e os esporos a 120°C por pelo menos 15 minutos;
- não esquecer que o esporo tem uma boa sobrevivência no solo, água e em produtos agrícolas.

2.1.6 Instalações laboratoriais

- o laboratório deve ser desenhado de modo a permitir fácil limpeza e descontaminação;
- é recomendável que a superfície das bancadas seja impermeável à água e resistente a ácidos, álcalis, solventes orgânicos e a calor moderado;
- os espaços entre as bancadas, cabines e equipamentos devem ser suficientes de modo a permitir acesso fácil para limpeza;
- cada laboratório deve possuir uma pia para lavagem das mãos;
- uma autoclave deve estar disponível para descontaminação no interior ou próximo ao laboratório de modo a permitir a descontaminação de todo material previamente ao seu descarte.

2.1.7 Manipulação de animais de experimentação com toxina botulínica

- a porta principal deverá estar sempre trancada. O acesso ao biotério deverá ser restrito às pessoas credenciadas, conforme determinado pelo responsável legal da instituição;
- a construção do biotério deverá ser de forma a facilitar a limpeza e a desinfecção e evitar o acúmulo de poeira;
- animais de diferentes espécies e não envolvidos em um mesmo experimento deverão estar alojados em áreas fisicamente separadas;
- todo material proveniente dos animais inoculados deverá ser descartado de forma a impossibilitar seu uso como alimento por outros animais, salvo o caso em que este seja o propósito do experimento, ou se especificamente autorizado pelo responsável legal ou outra instituição competente, se aplicável;
- toda manipulação deverá ser realizada de forma a evitar a liberação acidental do animal inoculado no meio ambiente;
- o responsável legal deverá estabelecer normas para que apenas as pessoas autorizadas, qualificadas e cientes dos riscos inerentes aos experimentos tenham acesso ao biotério. Quando

apropriado, estas pessoas deverão estar vacinadas contra os agentes infecciosos relacionados ao experimento;

- é necessário que haja uma ante-sala entre a área de livre circulação e a área onde os animais estão alojados. Toda a forma de ventilação existente entre a área de circulação livre e a ante-sala e entre a ante-sala e a sala dos animais deverá possuir barreiras físicas que bloqueiem a passagem de insetos ou outros animais;
- material contaminado deverá ser apropriadamente acondicionado conforme boas práticas laboratoriais para desinfecção, que poderá ocorrer fora do biotério;
- agulhas, seringas ou qualquer outro instrumento que possa causar solução de continuidade da pele deverão ser acondicionados em recipientes resistentes até o momento da desinfecção. É obrigatório o uso de máscara, gorro, luva e protetores para os pés. Estes materiais deverão ser sempre descontaminados após o uso.

Equipe técnica

Coordenação

Rejane Maria de Souza Alves

Equipe de elaboração

Ana Antunes Fonseca de Lucena

Dilma Scala Gelli

Demócrito de Barros Miranda Filho

Gilma Monteiro Padilha Holanda

Greice Madeleine Ikeda do Carmo

Hisako Gondo Higashi

Lúcia Helena Berto

Maria Angelina da Silva Zuque

Maria Lenilza de Albuquerque

Miyoko Jakabi

Neusa Maria Sosti Perini

Rejane Maria de Souza Alves

Rita de Cássia Saldanha de Lucena

Ricardo Kerti Albernaz

Sergio Garay

Equipe de revisão técnica

Ailton de Souza Melo

Ana Antunes Fonseca de Lucena

Berenice Cataldo de Oliveira Valério

Demócrito de Barros Miranda Filho

Greice Madeleine Ikeda do Carmo

Irênio Gomes da Silva Filho

Laura Arruda

Miyoko Jakabi

Rejane Maria de Souza Alves

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde:

<http://www.saude.gov.br/bvs>

O conteúdo desta e de outras obras da Editora do Ministério da Saúde pode ser acessado na página:

<http://www.saude.gov.br/editora>



EDITORA MS

Coordenação-Geral de Documentação e Informação/SAA/SE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

(Normalização, revisão, editoração, impressão, acabamento e expedição)

SIA, trecho 4, lotes 540/610 – CEP: 71200-040

Telefone: (61) 3233-2020 Fax: (61) 3233-9558

E-mail: editora.ms@saude.gov.br

Home page: <http://www.saude.gov.br/editora>

Brasília – DF, dezembro de 2006

OS 0091/2006