

# PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Brazilian Journal of Veterinary Research

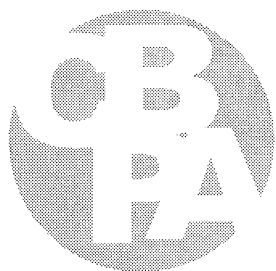


ISSN 0100-736X

**PESQUISA  
VETERINÁRIA  
BRASILEIRA**

**Brazilian Journal of Veterinary Research**

**VOLUME 16, 1996**



**Revista do Colégio Brasileiro de Patologia Animal**

# PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

- revista editada pelo Colégio Brasileiro de Patologia Animal  
A Brazilian Journal of Veterinary Research published by the Brazilian College of Animal Pathology

É revista bilíngüe trimestral que publica trabalhos originais de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a Saúde Pública.

## *Editorial Policy*

*Pesquisa Veterinária Brasileira, a bilingual quarterly journal, edited by the Brazilian College of Animal Pathology, publishes original articles and review papers on all aspects of veterinary science. Contributions on animal pathology and related subjects, mainly diseases of economic importance, are particularly welcomed. Reviews should be written in support of original investigation. The editors assume that papers submitted are not being considered for publication in other journals and do not contain material which has already been published.*

*Editor: Jürgen Döbereiner, Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970, Brasil.*

*Editores Adjuntos: Severo Sales de Barros, Santa Maria  
Osmane Hipólito, São Paulo  
Jerome Langenegger, Rio de Janeiro  
Hugo Barboza de Rezende, Rio de Janeiro  
Adayr Mafuz Saliba, São Paulo  
Jefferson Andrade dos Santos, Niterói  
Carlos Hubinger Tokarnia, Rio de Janeiro*

## *Assessoria Científica (Advisory Board)*

<i>C.C.P. Arteche, Porto Alegre</i>	<i>L. Grisi, Rio de Janeiro</i>	<i>A. Mayr, München</i>
<i>E.H. Birgel, São Paulo</i>	<i>E. Grunert, Hannover</i>	<i>H. Merkt, Hannover</i>
<i>H. Blobel, Giessen</i>	<i>J.A. Guimarães, Rio de Janeiro</i>	<i>G.E. Moya, Rio de Janeiro</i>
<i>P.G. Cabral, Porto Alegre</i>	<i>G. Habermehl, Hannover</i>	<i>R. Reis, Belo Horizonte</i>
<i>A.F.P. Castro, Campinas</i>	<i>E. Hofer, Rio de Janeiro</i>	<i>I.B.M. Sampaio, Belo Horizonte</i>
<i>M.S. Dayrell, Coronel Pacheco</i>	<i>M.R. Honer, Rio de Janeiro</i>	<i>H.G. Schatzmayr, Rio de Janeiro</i>
<i>G. Dirksen, München</i>	<i>M. Mariano, São Paulo</i>	<i>L.-CL. Schulz, Hannover</i>

A revista é editada dentro do

Programa de Apoio a Publicações Científicas

MCT/PR



em colaboração com o

Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, revista bilíngüe trimestral, editada pelo Colégio Brasileiro de Patologia Animal, publica trabalhos originais de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública. Os autores devem fazer com que seus trabalhos, quando a ela destinados, sejam preparados de acordo com as instruções publicadas na própria revista.

#### *Editorial Policy*

*Pesquisa Veterinária Brasileira, a bilingual quarterly journal, edited by the Brazilian College of Animal Pathology, publishes original articles and review papers on all aspects of veterinary science. Contributions on animal pathology and related subjects, mainly diseases of economic importance and of interest to Public Health, are particularly welcomed. Reviews should be written in support of original investigation. The editors assume that papers submitted are not being considered for publication in other journals and do not contain material which has already been published.*

#### *Conselho Editorial (Editorial Board)*

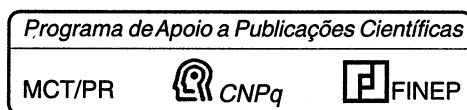
**Editor:** Jürgen Döbereiner. **Editores Adjuntos:** Severo Sales de Barros, Jerome Langenegger, Hugo Barboza de Rezende, Jefferson Andrade dos Santos, Carlos Hubinger Tokarnia.

#### *Assessoria Científica (Advisory Board)*

Carlos Cypriano P. Arteche, Eduardo H. Birgel, Hans Blobel, Pedro Gonçalves Cabral, A.F. Pestana de Castro, Milton de Souza Dayrell, Gerrit Dirksen, Laerte Grisi, Eberhard Grunert, Jorge Almeida Guimarães, Gerhard Habermehl, Ernesto Hofer, Michael R. Honer, Mario Mariano, Anton Mayr, Hans Merkt, Gonzalo E. Moya, Ronaldo Reis, Carlos H. Romero, Ivan B. Machado Sampaio, Hermann G. Schatzmayr, L.-Cl. Schulz.

A correspondência referente à publicação de trabalhos e a outros assuntos técnico-científicos editoriais deve ser endereçada ao (*All editorial communications, including typescripts, should be addressed to*) Dr. Jürgen Döbereiner, Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970 (Brasil); Tel. (021) 682-1082; Fax (021) 682-1109.

A revista é editada dentro do



em colaboração com o  
Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ

Figura da capa: Lesões peridentárias da “cara inchada” em bezerras com 2 meses de idade. O trabalho contido neste fascículo é mais uma contribuição no estudo da etiopatogenia da doença. (Schmitt et al., p.1)

*Cover illustration: Periodontal “cara inchada”-lesions in 2 months old calves. The paper published in this issue is a further contribution of research on the etiology and the pathogenic mechanisms of the disease. (Schmitt et al., p.1)*



# PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

- revista editada pelo Colégio Brasileiro de Patologia Animal

A Brazilian Journal of Veterinary Research published by the Brazilian College of Animal Pathology

Volume 16

Janeiro/Março 1996

Número 1

## SUMÁRIO

<b>“Cara inchada” and cellular immunity in cattle.</b> [“Cara inchada” e imunidade celular em bovinos.] <i>M. Schmitt, I.S. Dutra, J. Döbereiner, P.A. Kopp &amp; H. Blobel</i> .....	1-3
<b>Estudo experimental sobre a toxidez de algumas plantas ornamentais em bovinos.</b> <i>C.H. Tokarnia, A.G. Armien, P.V. Peixoto, J.D. Barbosa, M. F. Brito &amp; J. Döbereiner</i> ...	5-20
<b>Radiological study of hereditary lymphedema in Hereford cattle.</b> [Estudo radiológico de hipoplasia linfática hereditária em bovinos Hereford.] <i>A.L. Schild, L.P. Carapeto, F. Riet-Correa, M.C. Méndez &amp; G. Guerreiro</i> .....	21-26
<b>Diagnóstico da deficiência de fósforo em bovinos pelos exames histológicos e microrradiográficos de costelas.</b> <i>C. Pilati, I.S. Dutra, K. Behrens, J. Döbereiner &amp; K. Dämmrich</i> .....	27-33
<b>Influência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite.</b> <i>E.S. Nicolau, A. Nader Filho, L.A. Amaral &amp; O.D. Rossi Júnior</i> .....	35-38
<b>Cross-reactions between <i>Yersinia enterocolitica</i> serotype 9 and <i>Brucella</i> spp in bovine and swine sera, in the area of Rio de Janeiro.</b> [Reações cruzadas entre <i>Yersinia enterocolitica</i> sorotipo 9 e <i>Brucella</i> spp em soros de bovinos e suínos, na área do Rio de Janeiro.] <i>N.S. Lázaro &amp; E. Hofer</i> .....	39-43

## CONTENTS

<b>“Cara inchada” and cellular immunity in cattle.</b> <i>M. Schmitt, I.S. Dutra, J. Döbereiner, P.A. Kopp &amp; H. Blobel</i> .....	1-3
<b>Experiments on the toxicity of some ornamental plants in cattle.</b> <i>C.H. Tokarnia, A.G. Armien, P.V. Peixoto, J.D. Barbosa, M. F. Brito &amp; J. Döbereiner</i> .....	5-20
<b>Radiological study of hereditary lymphedema in Hereford cattle.</b> <i>A. Schild, L.P. Carapeto, F. Riet-Correa, M.C. Méndez &amp; G. Guerreiro</i> .....	21-26
<b>Diagnosis of phosphorus deficiency in cattle by histologic and microradiographic examination of ribs.</b> <i>C. Pilati, I.S. Dutra, K. Behrens, J. Döbereiner &amp; K. Dämmrich</i> ...	27-33
<b>Influence of subclinical staphylococci mastitis on physical, chemical and cellular milk characteristics.</b> <i>E.S. Nicolau, A. Nader Filho, L.A. Amaral &amp; O.D. Rossi Júnior</i> .....	35-38
<b>Cross-reactions between <i>Yersinia enterocolitica</i> serotype 9 and <i>Brucella</i> spp in bovine and swine sera, in the area of Rio de Janeiro.</b> <i>N.S. Lázaro &amp; E. Hofer</i> .....	39-43

## EDITORIAL

Neste primeiro fascículo do 16º volume (1996) da revista Pesquisa Veterinária Brasileira foram introduzidas algumas melhorias na apresentação gráfica dos artigos, para simplificar e facilitar ainda mais tanto a digitação como a leitura e captação do seu conteúdo. Com isto, o periódico está na vanguarda das publicações de medicina veterinária do país e pretende influenciar positivamente outras revistas científicas, a fim de que estas também aperfeiçoem a sua qualidade.

A Associação Brasileira de Editores Científicos (ABEC) tem realizado vários cursos de editoração científica nas diferentes regiões do país e contribuiu, com isto, para o aperfeiçoamento da política editorial de periódicos brasileiros. Esta orientação foi dada dentro do espírito do Programa de Apoio a Publicações Científicas do CNPq-Finep, que visa a concentração de esforços para que cada subárea de conhecimento possua pelo menos uma revista "de peso" com âmbito nacional, e até internacional, para que os recursos disponíveis sejam utilizados com a maior eficácia. Os periódicos editados por Sociedades Científicas estão merecendo preferência nesse Programa. Parcerias das Sociedades com Universidades e fusões de revistas estão sendo sugeridas para evitar duplicidade e obter a massa crítica necessária para o aumento de sua periodicidade e a garantia de qualidade.

Autocrítica e conscientização dos envolvidos, neste processo de desenvolvimento científico, são imprescindíveis para a modificação de atitudes editoriais e para o alcance do sucesso desejado.

JÜRGEN DÖBEREINER

COLÉGIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA ANIMAL  
Fundado em 28 de setembro de 1978

Diretoria e Conselho 1996/2000

- Presidente:* Jürgen Döbereiner, *Embrapa-Saúde Animal, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970*
- Vice-Presidente:* Claudio S.L. Barros, *Univ. Fed. Santa Maria, RS*
- Primeiro-Secretário:* Jerome Langenegger, *Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro*
- Segundo-Secretário:* Severo Sales de Barros, *Univ. Fed. Santa Maria, RS*
- Primeiro-Tesoureiro:* Carlos Hubinger Tokarnia, *Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro*
- Segundo-Tesoureiro:* Glaucia Denise Kommers, *Univ. Fed. Santa Maria, RS*
- Conselheiros:* Franklin Riet-Correa, *Univ. Fed. Pelotas, RS*  
Iveraldo dos Santos Dutra, *Unesp-Araçatuba, SP*  
Gervásio Henrique Bechara, *Unesp-Jaboticabal, SP*

SÓCIOS EMÉRITOS

*em homenagem póstuma*

Fúlvio José Alice  
Paulo Dacorso Filho  
Mário D'Apice  
Octávio Dupont  
Moacyr Gomes de Freitas  
Antonio Francisco Matera  
Francisco Megale  
Antonio Mies Filho  
Wilhelm Otto Neitz  
Adolpho Martins Penha  
Richard Karl Reinecke  
Sylvio Torres

SUMÁRIO  
List of Contents

Vol. 16, No. 1 Jan./Mar. 1996

<b>"Cara inchada" and cellular immunity in cattle.</b> ["Cara inchada" e imunidade celular em bovinos.] <i>M. Schmitt, I.S. Dutra, J. Döbereiner, P.A. Kopp &amp; H. Blobel</i> .....	1-3
<b>Estudo experimental sobre a toxidez de algumas plantas ornamentais em bovinos.</b> [Experiments on the toxicity of some ornamental plants in cattle.] <i>C.H. Tokarnia, A.G. Armien, P.V. Peixoto, J.D. Barbosa, M.F. Brito &amp; J. Döbereiner</i> .....	5-20
<b>Radiological study of hereditary lymphedema in Hereford cattle.</b> [Estudo radiológico de hipoplasia linfática hereditária em bovinos Hereford.] <i>A.L. Schild, L.P. Carapeto, F. Riet-Correa, M.C. Méndez &amp; G. Guerreiro</i> .....	21-26
<b>Diagnóstico da eficiência de fósforo em bovinos pelos exames histológicos e microrradiológicos de costelas.</b> [Diagnosis of phosphorus deficiency in cattle by histologic and microradiographic examination of ribs.] <i>C. Pilati, I.S. Dutra, K. Bebens, J. Döbereiner &amp; K. Dämmrich</i> .....	27-33
<b>Influência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite.</b> [Influence of subclinical staphylococci mastitis on physical, chemical and cellular milk characteristics.] <i>E.S. Nicolau, A. Nader Filho, L.A. Amaral &amp; O.D. Rossi Filho</i> .....	35-38
<b>Cross-reactions between Yersinia enterocolitica serotype 9 and Brucella spp in bovine and swine sera, in the area of Rio de Janeiro.</b> [Reações cruzadas entre Yersinia enterocolitica sorotipo 9 e Brucella spp em soros de bovinos e suínos, na área do Rio de Janeiro.] <i>N.S. Lázaro &amp; E. Hofer</i> .....	39-43

Vol. 16, Nos. 2/3, Abr./Set. 1996

<b>Pesquisa de anticorpos contra Brucella ovis em ovinos do Estado de São Paulo.</b> [Investigation of antibodies to Brucella ovis in sheep of the State of São Paulo.] <i>M. Marinho &amp; L. A. Mathias</i> .....	45-48
<b>Comparação entre o uso de tripaflavina e dimetridazole no tratamento da tricomonose bovina.</b> [Comparison of tripaflavina and dimetridazole in the treatment of bovine trichomoniasis.] <i>V.L.T. Jesus, H.G. Guida, V.L.B. Andrade, N.M. Serra-Freire, A.A. Ramos &amp; E.B.B. Pereira</i> .....	49-51
<b>Estreptomomicina aumenta a aderência em células epiteliais de Bacteroides melaninogenicus associado às lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos.</b> [Streptomycin increases the adherence on oral epithelial cells of Bacteroides melaninogenicus involved in the periodontal lesions of "cara inchada" in cattle.] <i>P.A. Kopp, I.S. Dutra, J. Döbereiner, M. Schmitt, B. Grassmann &amp; H. Blobel</i> .....	53-57
<b>Intoxicação experimental pelas sementes de Abrus precatorius (Leg. Papilionoideae) em ovinos.</b> [Experimental poisoning by the seeds of Abrus precatorius (Leg. Papilionoideae) in sheep.] <i>M.F. Brito, A.G. Armien &amp; C.H. Tokarnia</i> .....	59-66
<b>Epidemiologia e quadro clínico do botulismo epizoótico dos bovinos no Estado de São Paulo.</b> [Epidemiological and clinical aspects of the epizootic botulism of cattle in the State of São Paulo.] <i>J.A.N. Lisboa, M.R.G. Kuchembuck, I.S. Dutra, R.C. Gonçalves, C.T. Almeida &amp; I.R. Barros Filho</i> .....	67-74
<b>Brucelose ovina no Rio Grande do Sul.</b> [Brucella ovis infection of sheep in Rio Grande do Sul, Brazil.] <i>A. Magalhães Neto &amp; C. Gil-Torres</i> .....	75-79

<b>Ultra-estrutura das alterações ósseas na intoxicação experimental por <i>Solanum malacoxylon</i> em coelhos.</b> [Ultrastructural alterations of bone cells in the experimental <i>Solanum malacoxylon</i> poisoning in rabbits.] <i>S.S. Barros, D. Russowski &amp; S.M. Grando</i> .....	81-86
<b>Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina.</b> [Evolution of passive immunity against bovine leukemia virus.] <i>S.O. Hubner, R. Weiblen, F.L. Tobias, N. Cancian, S.A. Botton, M. Oliveira &amp; M. Zanini</i> .....	87-90
Vol. 16, No. 4, Out./Dez. 1996	
<b>Resultados de patologia clínica e dosagens de elementos minerais em bovinos acometidos pelo botulismo epizoótico no Estado de São Paulo.</b> [Clinical pathological data and analyses of mineral elements of cattle affected by epizootic botulism in the State of São Paulo.] <i>J.A.N. Lisboa, M.R.G. Kuchembuck, A. Kohayagawa, S.R.M. Bomfim, A.M.H. Santiago &amp; I.S. Dutra</i> .....	91-97
<b>Intoxicação experimental pelas sementes de <i>Ricinus communis</i> (Euphorbiaceae) em ovinos.</b> [Experimental poisoning by the seeds of <i>Ricinus communis</i> (Euphorbiaceae) in sheep.] <i>A.G. Armién, F.H.F. D'Angelis &amp; C.H. Tokarnia</i> .....	99-106
<b>Intoxicação experimental pelas sementes de <i>Abrus precatorius</i> (Leg Papilionoideae) em coelhos.</b> [Experimental poisoning by the seeds of <i>Abrus precatorius</i> (Leg. Papilionoideae) in rabbits.] <i>C.H. Tokarnia, M.F. Brito, P.S. Bezerra &amp; J. Döbereiner</i> ....	107-116
<b>Intoxicação por <i>Cestrum intermedium</i> (Solanaceae) em bovinos.</b> [Poisoning by <i>Cestrum intermedium</i> (Solanaceae) in cattle.] <i>A. Gava, M.S. Varaschin, D.S. Neves, A.P. Tigre &amp; F. Lesmann</i> .....	117-120
<b>Perfil de resistência a antimicrobianos em <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ST) e <i>Salmonella</i> sp em bezerros no agreste meridional de Pernambuco.</b> [Occurrence of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella</i> sp in calves in the southern agreste region of the State of Pernambuco, Brazil.] <i>C.L. Mendonça, N.S. Lázaro, R.S. Castro, J.A.B. Afonso &amp; E. Hofer</i> .....	121-125
<b>Intoxicação experimental por <i>Amaranthus</i> spp. (Amaranthaceae) em suínos no Rio Grande do Sul.</b> [Poisoning by <i>Amaranthus</i> spp. (Amaranthaceae) in pigs in Rio Grande do Sul, Brazil.] <i>G.D. Kommers, M.B. Torres, A.F. Dantas &amp; C.S.L. Barros</i> .....	127-131

#### ÍNDICE DOS AUTORES

##### Author Index

Afonso J.A.B. 127	Döbereiner J. 1, 5, 27, 53, 107	Mendonça C.L. 127
Almeida C.T. 67	Dutra I.S. 1, 27, 53, 67, 91	Nader Filho A. 35
Amaral L.A. 35	Gil-Turnes C. 75	Nicolau E.S. 35
Andrade V.L.B. 49	Gonçalves R.C. 67	Oliveira M. 87
Armién A.G. 5, 59, 99	Grando S.M. 81	Peixoto P.V. 5
Barbosa J.D. 5	Grassmann B. 53	Pilati C. 27
Barros C.S.L. 121	Guerreiro G. 21	Ramos A.A. 49
Barros S.S. 81	Guida H.G. 49	Riet-Correa F. 21
Barros Filho I.R. 67	Hofer E. 39, 127	Rossi Júnior O.D. 35
Behrens K. 27	Hübner S.O. 87	Russowiski D. 81
Bezerra P.S. 107	Jesus V.L.T. 49	Santiago A.M.H. 91
Bomfim S.R.M. 91	Kohayagawa A. 91	Schild A.L. 21
Botton S.A. 87	Kommers G.D. 121	Schmitt M. 1, 53
Brito M.F. 5, 59, 107	Kopp P.A. 1, 53	Serra-Freire N.M. 49
Blobel H. 1, 53	Kuchembuck M.R.G. 67, 91	Tobias F.L. 87
Carapeto L.P. 21	Lázaro N.S. 39, 127	Tokarnia C.H. 5, 59, 99, 107
Cancian N. 87	Lisbôa J.A.N. 67, 91	Torres M.B. 121
Castro R.S. 127	Magalhães Neto A. 75	Weiblen R. 87
Dämmrich K. 27	Marinho M. 45	Zanini M. 87
D'Angelis F.H.F. 99	Mathias L.A. 45	
Dantas A.F. 121	Méndez M.C. 21	

**XXIV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Goiânia, Goiás, 3-7.6.1996**

(Endereço: Secretaria Executiva do XXIV CONBRAVET, Sociedade Goiana de Veterinária - SOGOVE, Rua Juriti esq. c/Tucanos, Qd. 146, Lt. 38, Setor Santa Geneveva, Goiânia, GO 74672-660; tel. (062) 264-1230/207-2933, fax (062) 207-1383

**XV PANVET - Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, Campo Grande, MS, Brasil, 21-25.10.1996**

(Comissão Organizadora: Av. Afonso Pena 2386, Ed. Dolor de Andrade, 8º andar, sala 84, Campo Grande, MS 79002-074; tel (067) 724-7071, fax (067) 383-4371, Comitê Científico (067) 724-4877)

XIV International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases, Limassol, Chipre, March 23-28, 1997.  
(Organized by: Veterinary Public Health Institute K. Polydorou, P.O. Box 284, Nicosia, Chipre)

## “CARA INCHADA” AND CELLULAR IMMUNITY IN CATTLE<sup>1</sup>

Martin Schmitt<sup>2</sup>, Iveraldo S. Dutra<sup>3</sup>, Jürgen Döbereiner<sup>4</sup>, Peter A. Kopp<sup>2</sup>  
and Hans Blobel<sup>2</sup>

SINOPSE.- Schmitt M., Dutra I.S., Döbereiner J., Kopp P.A. & Blobel H. 1996. [“**Cara inchada**” e **imunidade celular em bovinos**.] “Cara inchada” and cellular immunity in cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(1):1-3. Depto Produção e Saúde Animal, Unesp-Campus de Araçatuba, Cx. Postal 533, Araçatuba, SP 16050-680, Brazil.

Foram realizados estudos para verificar os possíveis efeitos da periodontite dos bezerros (“cara inchada”) sobre a imunidade celular, utilizando-se a determinação da aderência, fagocitose e quimiotaxia de *Bacteroides melaninogenicus* frente a granulócitos de animais com e sem lesões da enfermidade. A aderência de *B. melaninogenicus* foi significativamente inferior quando testada frente a granulócitos isolados de bezerros afetados pela “cara inchada” (CI). Da mesma forma, a fagocitose de *B. melaninogenicus* por polimorfonucleares (PMN) apresentou-se diminuída em animais com CI. Por outro lado, frente a *B. melaninogenicus*, o índice leucotático de PMN de bezerros com CI e de animais sadios do mesmo rebanho, pareceu levemente superior quando comparado com o de animais de área indene.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: “Cara inchada” dos bovinos, doença peridentária, periodontite, imunidade celular, Brasil.

ABSTRACT.- Attempts were made to study possible effects of the periodontal disease “cara inchada” (CI) on the cellular immunity of cattle, using adherence-, chemotaxis- and phagocytosis-determinations. Adherence of *Bacteroides melaninogenicus* to bovine granulocytes was significantly decreased in animals with CI. Phagocytosis of *B. melaninogenicus* by polymorphonuclear granulocytes (PMN) was also decreased in CI-diseased animals. Chemotaxis of the granulocytes appeared to be slightly increased in animals with CI and animals without CI coming from CI-affected herds.

INDEX TERMS: “Cara inchada” of cattle, periodontal disease, periodontitis, cellular immunity, Brazil.

### INTRODUCTION

“Cara inchada” of cattle (CI) is a periodontal disease occurring in Zebu breeds in West Central Brazil. The initial CI lesions develop during eruption of praemolar teeth. The disease could lead to loss of teeth, consequently to malnutrition and sometimes to death. As to the etiology of CI a possible nutritional deficiency could not be established (Döbereiner et al. 1990, Moraes et al. 1994, Rosa & Döbereiner 1994). The findings of Blobel et al. (1984) proved the presence of black pigmented *Bacteroides melaninogenicus* and *Actinomyces pyogenes*. *Bacteroides* produced collagenase, sulfatase, hyaluronidase and other “spreading” enzymes (Dutra et al. 1986) of pathogenic significance. This led to further studies on adherence, phagocytosis and chemotaxis of *B. melaninogenicus* to granulocytes of CI-affected and non-affected cattle.

### MATERIALS AND METHODS

*Selection of animals.* Calves from a farm with CI in Mato Grosso do Sul, Brazil, were taken for the studies. Of these 14 were affected with CI (I) and 14 did not show periodontal lesions (II). Furthermore, 24 healthy animals from a farm with no history of CI in São Paulo served as controls (III). All calves were in the age range between 4 and 8 months.

*Preparation of granulocytes.* Blood was taken by puncture of the *V. jugularis* from the above-mentioned calves. Titriplex III, (EDTA 25 mM, Merck Darmstadt, FRG) served as anticoagulant.

<sup>1</sup>Accepted for publication on October 25, 1995.

Supported in part by Grand-in-Aid for scientific research (95/0169-5) from FAPESP/DAAD, a Bilateral Agreement Brazil-Germany.

<sup>2</sup>Institut für Bakteriologie und Immunologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus Liebig-Universität Giessen, Frankfurter Str. 107, D-35392 Giessen, Alemanha.

<sup>3</sup>Depto Produção e Saúde Animal, Unesp-Campus de Araçatuba, Cx. Postal 533, Araçatuba, SP 16050-680; Research Fellow of CNPq (305967/85-1).

<sup>4</sup>Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970; Research Fellow of CNPq (305294/88-1).

The polymorphonuclear granulocytes (PMN) were isolated by Histopaque® (Sigma Deisenhofen, FRG) separation (Steigbigel et al. 1974). The remaining red blood cells were lysed by resuspending the cell pellet in 0.87% NH<sub>4</sub>Cl, pH 9.4, followed by 1 washing in Hank's balanced salt solution (HBSS, 10 min at 1000xg). Then the suspensions of the PMN were adjusted to a final concentration of 5x10<sup>6</sup> cells/ml. Their viability was checked by trypan blue exclusion (0.01% final concentration).

**Adherence assays.** These were conducted and evaluated by fluorescence microscopy according to the methods of Valentin-Weigand et al. (1987). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-stained *B. melaninogenicus* (10<sup>8</sup> bacteria/ml) and PMN (10<sup>6</sup>/ml) were incubated for 60 min at 37°C in a shaking water bath at 60 rpm. After washing the PMN (10 min at 1000xg) droplets of the PMN were placed on microscopic glass slides and studied under oil immersion of a Zeiss ultraviolet microscope (1000x magnification). The results were expressed as means of adherent *B. melaninogenicus*/PMN.

**Chemotaxis assays.** Chemotaxins were produced by incubating serum with yeast zymosan (5mg/ml, 30 min at 37°C) which cleaves the 3rd and 5th component of complement (Ward & Maderazo 1980). Chemotaxis was carried out in modified Boyden acrylic chambers, using Sartorius cellulose nitrate filters with an average pore size of 5 microns (Boyden 1962). The upper compartment of the chamber received 0.5 ml of the PMN suspension (2.5x10<sup>5</sup> PMN/ml), the lower compartment 0.5 ml of the chemotaxins (20 µl serum in 480 µl HBSS). The chambers were incubated for 2 h at 37°C in a humidified incubator. Then the filters were removed, fixed in 98% ethanol (10 s), stained with haematoxylin (3 min) and dehydrated in absolute ethanol (10 min). Subsequently, the filters were cleared in xylene (10 min), mounted on microscopic glass slides with Caedax® (Merck) and covered with a thin cover slip. The chemotactic migration was quantitated by adding the number of PMN in focus at intervals of 10 microns from the top of the filter to the distal surface. The counts were started at 20 µm to minimize errors resulting from a possible spontaneous migration. The number of cells counted at each level was multiplied by the distance of that level from the proximal surface. The products obtained were added and the sum, divided by total number of the cells, yielded the "leucotactic index" [LI] (Ward & Maderazo 1980). Suspensions of PMN without chemotactic factors served as controls.

**Phagocytosis assays.** Suspensions of acridinorange-labelled *B. melaninogenicus* were prepared according to the method of Verhoef et al. (1977). To 225 µl of each suspension (10<sup>9</sup> cells/ml), 25 µl serum were added. The suspensions were incubated for 30 min at 37°C in a shaking water bath. Then 100µl of the opsonized bacteria were added to 100µl of the PMN suspension in Eppendorf tubes. The capped tubes were rotated for 2 h at 37°C in a shaking water bath. Phagocytosis was stopped by flooding the suspension with 200 µl of a acridinorange solution (20 µl/ml) and 800 µl ice-cold HBSS. Immediately after washing the PMN (twice in ice-cold HBSS at 1000xg) the pellets were resuspended in 50 µl HBSS. Drops of the resuspended cells were studied on microscopic glass slides under oil immersion in a Zeiss ultraviolet microscope (1000x magnification). The results were expressed as means of intracellularly killed (red) and live (green) bacteria after counting respectively 50 PMN.

## RESULTS

**Adherence.** PMN from calves with CI from an affected herd (I) yielded the lowest adherence values, followed by

those calves with no periodontal lesions, but of the same herd (II). In contrast, CI-negative animals from a CI-free herd (III) yielded the highest rates of bound *B. melaninogenicus*/PMN (Table 1).

Table 1. Rates of adhered *B. melaninogenicus*/PMN

I n=14	II n=14	III n=24
0.54	1.2	1.5

**Chemotaxis.** All PMN responded to the chemotactic gradients. PMN migration through the filter was 70 µm, spontaneous migration only 10 µm. PMN of the CI-positive calves (I) revealed an average LI of 30.1 and those from animals without periodontal lesions but from the same herd yielded an LI of 29.1 (II). PMN of the healthy control group (III) had an LI of 24.8. Thus, chemotaxis of PMN from CI-positive animals appeared to be slightly increased in comparison to that of PMN from healthy calves (Table 2).

Table 2. Leucotactic index (LI) rates<sup>a</sup>

I n=14	II n=14	III n=24
30.1	29.1	24.8

<sup>a</sup>Chemotaxis: LI 20 (average migration of PMN in the filter).

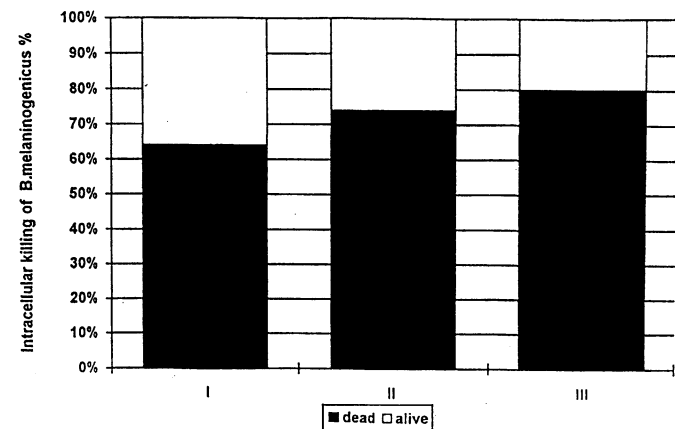


Fig. 1. Intracellular killing of *B. melaninogenicus* by PMN of CI positive-animals (I), animals from the same herd with no signs of the disease (II) and animals of the CI-negative control group (III).

**Phagocytosis.** The PMN from calves with CI revealed the lowest intracellular killing rates followed by those from CI-free animals of the same herd. The PMN from the CI-negative control group yielded the highest intracellular rates. (Fig. 1)

## DISCUSSION

The etiology and the pathogenic mechanisms of CI are still not completely known. Phagocytic cells such as granulocytes play an essential role in host defense against bacterial

pathogens. Their decreased functions in either adherence, chemotaxis or phagocytosis could be associated with predispositions for bacterial infections. The deficiencies might also constitute a predisposition for CI, the Chediak syndrome (Tempel et al. 1972), the localized juvenile periodontitis (Van Dyke et al. 1985), or the bovine adhesion deficiency "BLAD" (Takahashi et al. 1987). It was demonstrated that CI-affected animals revealed the lowest adherence of *B. melaninogenicus* to PMN. The phagocytic and bactericidal functions of PMN from these animals were found to be less effective than those of the healthy control group. Thus, it may be concluded that the deficiencies of the granulocytes in adherence and phagocytosis possibly constitute predisposing factors in the pathogenesis of CI.

*Agradecimentos.*- We thank Dr. Clara Izabel de Lucas Ferrari, research worker of Instituto Biológico, São Paulo, Regional de Araçatuba, for her help during the experimental work.

## REFERENCES

- Blobel H., Döbereiner J., Lima F.G.F. & Rosa I.V. 1984. Bacterial isolations from Cara inchada-lesions of cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 4(2):73-77.
- Boyden S. 1962. The chemotactic effects of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 115:453-466.
- Döbereiner J. 1990. Zur Ätiologie der "Cara inchada", einer parodontalen Erkrankung der Jungrinder in Brasilien. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 97(11):441-508.
- Dutra I.S., Kanoe M. & Blobel H. 1986. Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 6(2):59-63.
- Moraes S.S., Silva G.N. & Döbereiner J. 1994. Microelementos minerais e a "cara inchada" dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 14(1):25-33.
- Rosa I.V. & Döbereiner J. 1994. "Cara inchada" dos bovinos e deficiências minerais. *Pesq. Vet. Bras.* 14(1):42-48.
- Schlote D., Hadam M., Stöber M., Heinz H., Schuberth J., Ziesenis A. & Leibold W. 1991. Immunological characterization of a case of bovine leucocyte adhesion deficiency (BLAD). 22nd Ann. Annu. Meet. Ges. Immunol., Lübeck, Travemünde. (Abstr. Immunology 1991)
- Steigbigel R.T., Lambert Jr. L.H. & Remington J.S. 1974. Phagocytic and bactericidal properties of normal human monocytes. *J. Clin. Invest.* 53:131-152.
- Takahashi K., Miyagawa K., Abe S., Kurosawa T., Sonoda M., Nakade T., Nagahada H., Noda H., Chihaya Y. & Isogay E. 1987. Bovine granulocytopeny syndrome of Holstein-Friesian calves and heifers. *Jap. J. Vet. Sci.* 49:733-736.
- Temple T.R., Kimball H.R., Kakehashi S. & Amen C.R. 1972. Host factors in periodontal disease; periodontal manifestation of Chediak-Higashi syndrome. 2nd Int. Conf. on Periodontal Research, Denmark. (*J. Periodont. Res. (Suppl.)* 10.)
- Valentin-Weigand P., Chhatwal G.S. & Blobel H. 1987. A simple method for quantitative determination of bacterial adherence to human and animal epithelial cells. *Microbiol. Immunol.* 31:1017-1023.
- Van Dyke T.E., Levine M.J. & Genco J. 1985. Neutrophil function and oral disease. *J. Oral Pathol.* 14:95-120.
- Verhoef J., Peterson P., Sabath K. & Quie P. 1977. Kinetics of staphylococcal opsonization, attachment, ingestion and killing by human polymorphonuclear leucocytes: a quantitative assay using <sup>3</sup>H-thymidine labelled bacteria. *J. Immunol. Methods* 14: 303.
- Ward A.P. & Maderazo E.G. 1980. Leucocyte chemotaxis, p. 261-266. In: Rose R.N. & Friedman H. (ed.) *Manual of Clinical Immunology*. 2nd edition. ASM Press, Washington, D.C.

## ESTUDO EXPERIMENTAL SOBRE A TOXIDIZ DE ALGUMAS PLANTAS ORNAMENTAIS EM BOVINOS<sup>1</sup>

Carlos Hubinger Tokarnia<sup>2</sup>, Anibal Guillermo Armien<sup>3</sup>, Paulo Vargas Peixoto<sup>4</sup>,  
José Diomedes Barbosa<sup>5</sup>, Marilene de Farias Brito<sup>6</sup> e Jürgen Döbereiner<sup>7</sup>

ABSTRACT.- Tokarnia C.H., Armien A.G., Peixoto P.V., Barbosa J.D., Brito M.F. & Döbereiner J. 1996. [Experiments on the toxicity of some ornamental plants in cattle.] Estudo experimental sobre a toxidez de algumas plantas ornamentais em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(1):5-20. Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970, Brazil.

Due to inquiries about the toxicity of ornamental plants to farm animals, and the few data available in the literature on this subject, feeding experiments were performed in cattle with the following plants: *Allamanda cathartica*, *Nerium oleander* and *Thevetia peruviana* of the Apocinaceae family, *Codiaeum* sp., *Euphorbia cotinifolia*, *Euphorbia pulcherrima* and *Euphorbia tirucalli* of the Euphorbiaceae family, *Datura arborea* of the Solanaceae family, *Colocasia antiquorum*, *Dieffenbachia picta*, *Monstera deliciosa*, *Philodendron hastatum*, *Philodendron sellowii* (= *P. sellowii*) and *Scindapsus aureus* (= *Epipremnum aureum*) of the Araceae family, *Rhododendron ledifolium* and *Rhododendron indicum* of the Ericaceae family, and *Malva viscosa* of the Malvaceae family.

The only plants which caused lethal poisoning were *Allamanda cathartica*, *Nerium oleander*, *Thevetia peruviana* and *Rhododendron indicum*. The lethal dose for *A. cathartica* was 30 g/kg (causing death of 2 of 3 bovines which received this dose), for *N. oleander* it varied from 0,25 to 0,5 g/kg (0,25 killed 1 of 4 and 0,5 the 2 bovines which received this dose); *T. peruviana* caused death of 3 bovines with doses of 14,4 g/kg or more (out of 7 bovines which received these doses), and *R. indicum* caused death of the animal which received the highest dose which could be given, this is 29,39 g/kg, whilst a second bovine which received 29 g/kg suffered only severe poisoning.

Other plants that caused severe poisoning without lethal outcome were *Euphorbia pulcherrima*, in doses of 16,4 and 30 g/kg, *Rhododendron ledifolium* in one bovine which ingested 20 g/kg, the highest dose of this plant administered. Moderate poisoning was caused by *Datura arborea* in one bovine which ingested 40 g/kg, by *Colocasia antiquorum* in 2 bovines which ingested 4 and 5,9 g/kg and by *Dieffenbachia picta* in 2 bovines, which ingested 3,7 and 4,8 g/kg of the respective plants. The other plants did not cause poisoning or only slight symptoms.

*Allamanda cathartica* caused mainly manifestations of colic and the most important post-mortem and histopathological findings were severe oedema of all parts of the wall

<sup>1</sup>Aceito para publicação em 30 de outubro de 1995.

<sup>2</sup>Depto Nutrição Animal e Pastagem, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 47, Seropédica, RJ 23851-970; bolsista do CNPq (305010/76-VT).

<sup>3</sup>Médico Veterinário, Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970.

<sup>4</sup>Depto Epidemiologia e Saúde Pública, Setor de Anatomia Patológica, UFRRJ; bolsista do CNPq (302342/86-9).

<sup>5</sup>Médico-Veterinário do Instituto de Veterinária, Setor de Grandes Animais, UFRRJ.

<sup>6</sup>Disciplina de Patologia Geral e Comparada, Depto Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Correa da Costa s/nº, Cuiabá, MT 78060-900.

<sup>7</sup>Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970; bolsista do CNPq (305294/88-1).

of the rumen and reticulum, and congestion of the mucosa of the remaining digestive tract.

*Nerium oleander* caused severe cardiac arrhythmia and severe diarrhoea, sometimes with blood. The post-mortem findings were generalized hemorrhages and the main histological lesion was necrosis of heart fibres.

*Thevetia peruviana* also caused heart arrhythmia and diarrhoea. Post-mortem and histopathological findings were negative with exception of one of the bovines which had diarrhoea, in which the contents of the rumen were putrid and those of the intestine were liquid.

*Euphorbia pulcherrima* caused severe weakness.

*Datura arborea* caused the symptoms of atropine poisoning.

*Rhododendron* spp. caused mainly regurgitation without or with vomits, sialorrhoea, manifestations of colic, diarrhoea and instability. Post-mortem and histopathological findings in the only bovine that died, were negative.

The plants of the Araceae family caused sialorrhoea and sublingual and submandibular oedema.

It is concluded, that the rarity of the poisoning in cattle under natural conditions by these plants is due to its low palatability and the fact that normally these plants are not available to bovines, and yet that most of these plants have to be ingested in large amounts to cause poisoning. An exception is *Nerium oleander*, whose lethal dose is low. It is practically the only ornamental plant of those tested in this study, which according to the data in the literature has caused cases of poisoning in cattle.

INDEX TERMS: Ornamental plants, experimental poisoning, cattle, plant poisoning, pathology.

SINOPSE.- Em virtude de consultas sobre a toxidez de algumas plantas ornamentais em relação aos animais de fazenda, e os escassos dados na literatura sobre esse assunto, foram efetuados experimentos em bovinos com as seguintes plantas: *Allamanda cathartica* ("alamanda"), *Nerium oleander* ("espirradeira") e *Thevetia peruviana* ("chapeu-de-Napoleão") da família Apocinaceae, *Codiaeum* sp. ("croton"), *Euphorbia cotinifolia* ("aiapana", "maleiteira"), *Euphorbia pulcherrima* ("bico-de-papagaio") e *Euphorbia tirucalli* ("aveloz") da família Euphorbiaceae, *Datura arborea* ("trombeteira") da família Solanaceae, *Colocasia antiquorum* ("orelha-de-elefante"), *Dieffenbachia picta* ("comigo-ninguém-pode"), *Monstera deliciosa* ("costela-de-Adão"), *Philodendron hastatum* ("filodendron"), *Philodendron sellowii* (= *P. sellowii*) ("banana-de-macaco") e *Scindapsus aureus* (= *Epipremnum aureum*) ("jibóia", "jibóia-dourada") da família Araceae, *Rhododendron ledifolium* e *Rhododendron indicum* ("azaléia", "rododendron") da família Ericaceae, *Malvaviscus arboreus* ("papoula", "graxa-de-estudante", "chupetinha") da família Malvaceae.

Verificou-se que as únicas plantas que causaram intoxicação grave com êxito letal, foram *Allamanda cathartica*, *Nerium oleander*, *Thevetia peruviana* e *Rhododendron indicum*. A dose letal para *A. cathartica* foi de 30 g/kg, que matou 2 dos 3 bovinos que a receberam nesta dose, para *N. oleander* foi de 0,25 a 0,5 g/kg (0,25 matou 1 de 4 e 0,5 g/kg os 2 bovinos que a receberam nessas doses); *T. peruviana* causou a morte de 3 bovinos em doses a partir de 14,4 g/kg, entre 7 bovinos que a receberam nessas doses, e *R. indicum* causou a morte do bovino que ingeriu a

maior dose que se conseguiu administrar, isto é 29,39 g/kg, enquanto um segundo que recebeu 29 g/kg adoeceu gravemente.

Causaram intoxicação grave ainda, sem êxito letal, *Euphorbia pulcherrima*, em doses de 16,4 e 30 g/kg, e *Rhododendron ledifolium* em um bovino que ingeriu 20 g/kg, a maior dose administrada desta planta. Intoxicação de intensidade moderada foi causada por *Datura arborea* em um bovino que ingeriu 40 g/kg, por *Colocasia antiquorum* em 2 bovinos que ingeriram 4 e 5,9 g/kg e por *Dieffenbachia picta* em 2 bovinos que ingeriram 3,7 e 4,8 g/kg das respectivas plantas. As outras plantas não causaram intoxicação ou somente leves sintomas.

*Allamanda cathartica* causou cólica como principal manifestação clínica e os achados de necropsia e histopatológicos mais importantes foram edema acentuado de todas as camadas da parede do rúmen e do retículo, além de congestão da mucosa do restante do tubo digestivo.

*Nerium oleander* causou grave arritmia cardíaca e ainda acentuada diarréia, às vezes com sangue. Os achados de necropsia foram hemorragias generalizadas e a principal alteração histopatológica foi necrose de fibras cardíacas.

*Thevetia peruviana* também causou arritmia cardíaca e diarréia. Não foram verificadas alterações à necropsia e nos exames histopatológicos, a não ser em um dos bovinos que teve diarréia, em que o conteúdo do rúmen estava com cheiro pútrido e o de todo intestino estava líquido.

*Euphorbia pulcherrima* causou grande debilidade.

*Datura arborea* causou sintomas de intoxicação por atropina.

*Rhododendron* spp. provocaram principalmente regurgitamento sem ou com vômito, sialorréia, cólica, diarreia e perturbações de equilíbrio. Os achados de necropsia e histopatológicos no único bovino que morreu foram negativos.

As plantas da família Araceae causaram sialorréia e edemas sublingual e submandibular.

Conclui-se, que a raridade de casos de intoxicação por essas plantas, sob condições naturais em bovinos, deve estar ligada a dois fatores: à sua baixa palatabilidade e à falta de acesso dos bovinos a essas plantas de uma maneira geral, ainda mais que da maioria delas quantidades elevadas têm que ser ingeridas para causar quadro de intoxicação. Exceção constitui *Nerium oleander*, da qual doses pequenas das folhas já são letais. É praticamente a única planta ornamental das testadas nesse trabalho, sobre a qual há registros na literatura de casos de intoxicação natural em bovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas ornamentais, intoxicação experimental, bovinos, intoxicação por planta, patologia.

## INTRODUÇÃO

As plantas ornamentais tóxicas são um grupo de plantas muito comentadas e há numerosas publicações sobre elas (Steyn 1941, Aplin 1976, Fowler 1980, Albuquerque 1980, Scavone & Panizza 1980, Frohne & Pfänder 1984, Roth et al. 1984, Wagstaff 1992). Porém os conhecimentos sobre a toxidez das plantas ornamentais se baseiam principalmente em observações de casos naturais no homem, em estudos químicos e alguma experimentação em animais de laboratório. Há poucos registros de casos naturais e ainda menos estudos experimentais em animais de fazenda.

Em virtude de às vezes recebermos consultas sobre a toxidez de plantas ornamentais em relação aos animais de fazenda, fizemos experimentos em bovinos e ovinos com algumas dessas plantas mais comuns no Brasil. Os resultados dos experimentos realizados em ovinos, foram publicados recentemente (Armién & Tokarnia 1994, Armién et al. 1994, 1995). No presente trabalho são apresentados os resultados de experimentos em bovinos com plantas ornamentais encontradas no Brasil.

## REVISÃO DE LITERATURA

Uma revisão da literatura das plantas ornamentais, submetidas a experimentação nesse trabalho, revela que a ocorrência de casos de intoxicação natural com as folhas destas plantas em bovinos praticamente só tem sido registrada com *Nerium oleander*.

Há ainda um único registro sobre a ocorrência da intoxicação por *Colocasia* sp. em bovinos.

Além de estudos experimentais realizados em bovinos com as folhas de *N. oleander*, verificamos na literatura ainda o registro de experimentos em bovinos com as folhas de *Thevetia* e *Datura arborea*.

Abaixo estão os principais dados da literatura sobre o assunto.

### *Nerium oleander*, *Nerium* spp.

#### *Intoxicação natural*

A espécie animal em que a maioria dos casos de intoxicação natural por *N. oleander* tem sido relatada, é a bovina. Mas mesmo assim uma revisão da literatura revela poucos trabalhos.

Ceccherelli (1929) descreve um surto de intoxicação por "oleander" em 6 bovinos e 30 ovinos, dos quais morreram 4 bovinos e 8 ovinos. Dentro de 8 a 10 horas após ingestão das folhas foram observados apatia, anorexia, parada da ruminação, timpanismo, diarreia fétida, mais tarde cólica, dilatação das pupilas, dispnéia, pulso fraco intermitente, batimentos cardíacos tumultuados, trituração dos dentes, urina abundante turva, diarreia com fezes líquidas sanguinolentas, pretas com muito mau cheiro; finalmente convulsões, paralisia e êxito letal. A necropsia revelou gastrenterite hemorrágica grave, dilatação do coração, hemorragias no endocárdio, cérebro, nas meninges e serosas. Os animais sobreviventes se recuperaram em 10 a 15 dias, com tratamento.

Henning (1932) menciona a intoxicação por "oleander" em uma vaca que recebeu feno que continha folhas da planta. Inicialmente as extremidades e o nariz ficaram frios, mais tarde seguiram se contrações semelhantes a caimbra de todos os músculos, e finalmente paralisia.

Quortrup & McFarland (1956) descrevem dois casos de intoxicação por "oleander". No 1º caso, de 17 cabeças de gado que invadiram um pasto, 8 amanhecera doentes; dois animais morreram logo e um 3º no dia seguinte. Foram encontradas folhas de "oleander" no pasto. À necropsia foram encontradas folhas da planta no rúmen. No 2º caso, um bezerro com 8 meses de idade foi alimentado com o aparado do gramado que continha folhas de "oleander".

De acordo com Hurst (1942), uma vaca morreu e três outras ficaram doentes em um ocorrência na Austrália em 1934. No estômago foi encontrado material botânico fragmentado que parecia ser "oleander". Os sintomas foram os de gastrenterite severa. Em 1936 ocorreu uma mortalidade entre vacas leiteiras e bois. Quatro animais morreram e um adicional ficou doente. A ingesta continha grande porcentagem de material vegetal que com toda probabilidade foi "oleander". E em 1937 uma mortalidade em bovinos foi atribuída a "oleander", sem que maiores detalhes são fornecidos.

Thimmiah (1972) descreve a intoxicação em dois bovinos com aproximadamente 7 anos de idade, aos quais foi dado na boca (force-fed) *Nerium* sp. por um homem velho meio cego. Os animais ficaram muito apáticos, com as mucosas vermelhas, FC 50, FR 24, o pulso estava fraco e irregular, a respiração superficial e acelerada. Os animais tremiam. Mostravam anorexia. Um animal morreu no dia seguinte cedo e os achados de necropsia foram mucosas congestionadas, tecido subcutâneo com petéquias, presença de

1 litro de líquido citrino na cavidade torácica, pulmões edematosos e congestos. abomaso com úlceras, petéquias no abomaso, intestino e mesentério. O segundo bovino eliminou no 3º dia sangue e muco junto com as fezes. Após o 5º dia o animal melhorou, comendo um pouco e bebendo água, e após 12 dias foi dado alta.

Sobhan (1980) descreve doença em 2 vacas e 1 bezerro em que folhas de *Nerium indicum* foram encontradas misturadas ao capim cortado embaixo de arbustos desta espécie. Os animais estavam deprimidos, com anorexia, tinham focinho seco, diarreia, cólica, as extremidades frias, sialorréia e vômitos ocasionais. O pulso e a respiração estavam aumentados e a temperatura subnormal. Uma vaca morreu dentro de 24 horas após a última alimentação; a segunda vaca e o bezerro se recuperaram.

Pinto et al. (1981) relatam que 23 bovinos receberam incautamente folhas de *N. oleander*. Mostraram os seguintes sintomas após poucas horas: inquietação, cólica violenta, vômitos, salivação, ranger dos dentes, seguido por convulsões, contrações musculares tetânicas, diarreia hemorrágica, batimentos cardíacos irregulares e dispnéia. Onze bovinos foram abatidos nas primeiras 24 horas; os outros se recuperaram. Os achados de necropsia foram gastrenterite com algumas hemorragias, conetão renal e edema pulmonar.

Thakur & Verma (1982) relatam a intoxicação por folhas de *Nerium odorum* em 5 bovinos, os quais o proprietário tinha alimentado com capim cortado embaixo de árvore desta espécie. Os sintomas observados foram inquietação, dor abdominal, salivação excessiva, eliminação frequente de fezes e urina, trismo. Um animal morreu logo no primeiro dia, os outros já no dia seguinte mostraram melhora. No outro dia os animais já começaram a se alimentar normalmente.

Minardi et al. (1982) relatam a intoxicação em 5 vacas, das quais 4 morreram em menos de 48 horas; na 5ª a evolução foi de 5 dias. Os animais receberam acidentalmente junto com a grama de jardim cortada, folhas verdes de *N. oleander*. Os sintomas nas vacas que morreram dentro de 48 horas, foram diarreia preta, em uma vaca com fezes sanguinolentas, hipotermia, dores abdominais, cegueira, incoordenação, taquicardia com arritmia (6 a 8 batidas e parada por 3 segundos). À necropsia de uma vaca que morreu dentro de 48 horas, o que mais chamou atenção foi o rúmen com conteúdo líquido, com cheiro desagradável, e o intestino com coloração arroxeada. Os sintomas no animal que viveu 5 dias, foram anemia, anorexia, icterícia generalizada, emagrecimento, fezes escuras, fétidas e hemorrágicas. À necropsia se verificaram icterícia generalizada e hemorragias em diversas partes do organismo. No exame histológico foram observadas, como lesões principais, necrose de fibras cardíacas e miocardite focal não purulenta.

Mahin et al. (1984) reportam a morte de 8 de 17 bovinos que comeram galhos de *N. oleander* cortados e amontoados para serem queimados, juntos com galhos de *Ficus elastica* e *Cistrus* spp. Eles voltavam de um pasto pobre.

Uma vaca morreu no dia 1 pós-ingestão (PI), 5 vacas morreram no dia 2 PI e uma no dia 4 PI. Antes da morte os animais eram irrequietos. Um animal de repente mostrou-se excitado correndo para fora do estábulo e teve morte súbita. No dia 4 PI, 3 dos 9 bovinos restantes ainda mostravam tremores musculares, atonia ruminal, bradicardia e arritmia em 2 casos. À necropsia de uma novilha foram encontradas hemorragias subendocárdicas e no abomaso. No exame histológico foram constatadas hemorragias no coração e abomaso. O exame microscópico de epidermes vegetais encontradas no rúmen revelou a presença de *N. oleander* com suas células stomáticas típicas.

Vermunt (1987) reporta 3 casos fatais de intoxicação e 4 com recuperação em vacas, que de acordo com uma investigação, ingeriram galhos cortados de *N. oleander*. A necropsia das vacas não revelou lesões, a não ser grande quantidade de folhas e galhos de *N. oleander* no rúmen. As 4 vacas doentes que se recuperaram, tinham batimentos cardíacos fracos irregulares e pulso de 120/min.; duas gemiam e batiam com os pés no abdômen. Uma dessas 4 vacas abortou 2 dias mais tarde.

#### *Intoxicação experimental*

Poucos experimentos foram realizados em bovinos com *N. oleander*. De acordo com Wilson (1909) a dose letal para bovinos adultos varia de 10 a 20 g das folhas verdes e de 15 a 25 g das folhas dessecadas.

De acordo com Larkin, em Hurst (1942), 28 g das folhas moídas dadas frescas em um caso e secas em outro, causaram sintomas em bezerras, porém os animais se recuperaram.

Kehar & Rau (1945) realizaram experimento em garrote pesando cerca de 100 kg, que recebeu 200 g das folhas, caules e flores de *Nerium odoricum* numa suspensão aquosa. Após pouco tempo o animal emitia grunhidos e fazia esforço para vomitar. Urinava e defecava com frequência. Após aproximadamente 10 minutos o pulso ficou fraco e a respiração um pouco rápida. A morte ocorreu em convulsões em 35 a 40 minutos após a administração da planta. Os achados de necropsia foram leve congestão da parte fúndica do abomaso e do duodeno; o conteúdo do retículo era semifluido.

Lei & Zhang (1983) relatam em vacas que receberam 0,248 g/kg das folhas frescas de *Nerium* sp. apatia, cólica, ranger de dentes, gemidos, tremores musculares, hipotermia e morte em 1 a 3 dias devido a falha cardíaca com fibrilação ventricular esquerda. O pulso era de 80 a 125/min., quando começaram os sintomas, porém depois diminuiu para 37 a 61/min. e se tornou intermitente.

Bazargani & Mirslami (1991) administraram em cada uma das estações de outono, inverno e primavera a 5 bezerras 5, 10 e 15 folhas de "oleander" em cada um de 3 dias consecutivos. Sintomas de intoxicação apareceram no 4º dia. As manifestações mais constantes da intoxicação foram arritmia cardíaca inicialmente com bradicardia e depois com taquicardia. Anorexia, diarreia e hemorragias foram outros sinais clínicos menos consistentes. Os acha-

dos macro e microscópicos foram hemorragias em alguns tecidos.

#### *Thevetia peruviana*, *Thevetia* spp.

##### *Intoxicação natural*

Não encontramos relatos sobre a ocorrência da intoxicação natural pelas folhas de *Thevetia* spp. em bovinos.

##### *Intoxicação experimental*

Somente encontramos o trabalho de Lei & Zhang (1983), que administraram a bezerros as folhas dessecadas pulverizadas de *Thevetia* na dose de 1,1 g/kg. Os sintomas nesses bezerros de acordo com os autores, foram os mesmos que observaram na intoxicação em vacas a que administraram as folhas frescas de *Nerium* sp. na dose de 0,248 g/kg. (Vide acima)

#### *Datura arborea*

##### *Intoxicação natural*

Não encontramos relatos sobre a ocorrência da intoxicação natural pelas folhas de *Datura arborea*.

##### *Intoxicação experimental*

Só sabemos dos experimentos realizados por Tokarnia et al. (1967), em que foram administradas a três bovinos em uma única administração folhas, brotos e flores da planta, na proporção de 21,4 a 25 g/kg. Um animal mostrou inquietação no dia da administração da planta, e no dia seguinte tenesmo; os outros dois mostraram durante 24 horas após a administração da planta tumefação da região parotidiana, inquietação, timpanismo e tenesmo, com pronta recuperação.

#### *Colocasia* sp.

##### *Intoxicação natural*

Gowanloch & Brown (1943) registraram a ocorrência de irritação da boca e da língua em gado após ingestão das folhas de *Colocasia* sp.

##### *Intoxicação experimental*

Não encontramos dados sobre experimentos com *Colocasia* sp. realizados em bovinos.

Não encontramos dados sobre a intoxicação natural ou experimental em bovinos com as outras plantas ornamentais submetidas à experimentação nessa espécie animal no presente trabalho.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos consistiram na administração das folhas frescas, com pecíolo, de plantas ornamentais coletadas no Estado do Rio de Janeiro, a bovinos jovens. Exceção foi *Monstera deliciosa*

("costela-de-Adão"), da família Araceae, da qual foram administradas as folhas sem talos. No caso de *Euphorbia tirucalli* ("aveloz"), da família Euphorbiaceae, foram administradas as partes aéreas. As plantas eram introduzidas com a mão na boca dos animais, que as então mastigavam e deglutiam.

Procurou-se administrar sempre a maior quantidade possível. Exceção foi *Nerium oleander*, onde as doses administradas foram pequenas devido a sua elevada toxidez já conhecida.

Os animais eram mantidos em baias individuais, com água e capim à vontade. Antes, uma vez, e durante os experimentos, pelo menos três vezes ao dia; os animais eram examinados clinicamente. O consumo do capim e o aspecto das fezes eram controlados.

## RESULTADOS

Um delineamento e os principais dados dos experimentos realizados por nós com plantas ornamentais no Estado do Rio de Janeiro em bovinos, encontram-se no Quadro 1, agrupados de acordo com as famílias a que pertencem, e nos resumos dos dados experimentais referentes aos quadros clínico-patológicos dos animais que adoeceram.

Verifica-se que as únicas plantas que causaram intoxicação grave com êxito letal, foram *Allamanda cathartica*, *Nerium oleander*, *Thevetia peruviana* e *Rhododendron indicum*. A dose letal para *A. cathartica* foi de 30 g/kg, que matou 2 dos 3 bovinos que a receberam nesta dose; para *N. oleander* foi de 0,25 a 0,5 g/kg (0,25 matou 1 de 4 e 0,5 g/kg os 2 bovinos que a receberam nessas doses). *T. peruviana* causou a morte de 3 bovinos em doses a partir de 14,4 g/kg entre 7 bovinos que a receberam nessas doses. *R. indicum* causou a morte do animal que ingeriu a maior dose que se conseguiu administrar, isto é 29,39 g/kg, enquanto que um segundo que recebeu 29 g/kg adoeceu gravemente.

Causaram ainda intoxicação grave, porém sem êxito letal, *Euphorbia pulcherrima*, em doses a partir de 16,4 g/kg, e *Rhododendron ledifolium* em um bovino que ingeriu 20 g/kg da planta, a maior dose administrada.

Intoxicação de intensidade moderada foi causada por *Datura arborea* em um bovino que ingeriu 40 g/kg da planta, por *Colocasia antiquorum* em 2 bovinos que ingeriram aproximadamente 4 e 5,9 g/kg e por *Dieffenbachia picta* em 2 bovinos que ingeriram 3,7 e 4,8 g/kg.

As outras plantas não causaram intoxicação ou só leves sintomas.

Os quadros clínicos, achados de necropsia e alterações histológicas observados, foram os seguintes, planta por planta, agrupadas pelas famílias botânicas a que pertencem.

### Apocinaceae

*Allamanda cathartica* teve como principal manifestação clínica cólica, além de anorexia e atonia ruminal. Os achados de necropsia mais importantes foram referentes ao aparelho digestivo, sobretudo edema acentuado de todas as camadas do rúmen e retículo, além de congestão da mucosa do tubo digestivo. A alteração histológica mais

Quadro 1. Intoxicação experimental por algumas plantas ornamentais em bovinos. Delineamento dos experimentos

Planta		Bovino			Administração		Desfecho	Início dos sintomas após o início da administração da planta	Evolução	Morte após o início da administração da planta	Recuperação após o início da administração da planta
Família, Gênero e espécie (Nome popular)	Procedência	Data da coleta	Nº (SAP)	Peso kg	Data	Dose g/kg					
<b>Apocinaceae</b>											
<i>Allamanda cathartica</i> ("Alamanda")	Mun. Itaguaí, UFRRJ	1.2.94	5202	209	1.2.94	20,0	Adoeceu(+) <sup>a</sup>	9h13min	1 dia	-	1 dia 9h
	"	11.1.95	5204	170	11.1.95	20,0	Adoeceu+	23h34min	2 dias	-	3 dias
	"	4.2.94	5206	182	4.2.94	30,0	Adoeceu+	18h50min	2 dias	-	3 dias
	"	30.1.94	5221	156	30.1.95	30,0	Morreu	5h50min	28h36min	34h29min	-
	"	29.11.94	5222	195	29.11.94	30,0	Morreu	8h41min	9h04min	17h45min	-
	"	25.1.95	5223	228	25.1.95	20,0	Adoeceu+	25h02min	1 dia 6h	-	2 dias 7h
	"	9.1.95	5226	237	9.1.95	10,0	Sem sintomas	-	-	-	-
<i>Nerium oleander</i> ("Espirradeira")	Mun. Itaguaí, UFRRJ	3.2.93	5202	208	3.2.93	0,1	Adoeceu +(+)	29h34min	4 dias	-	5 dias
	"	25.1.93	5203	203	25.1.93	0,05	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	17.7.93	5204	117	17.7.93	0,25	Adoeceu +	10h27min	5 dias	-	5 dias 11h
	"	7.6.93	5205	154	7.6.93	0,2	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	14.2.95	5206	201	14.2.95	0,25	Morreu	13h00min	53h53min	2 dias 19h	-
	"	15.6.93	5207	155	15.6.93	0,5	Morreu	7h25min	5 dias 12h	Quase 6 dias	-
	"	14.7.93	5208	155	14.7.93	0,5	Morreu	19h12min	2 dias 2h	Quase 3 dias	-
	"	9.1.95	5223	235	9.1.95	0,25	Adoeceu+++	17h52min	6 dias 15h	-	7 dias 9h
<i>Thevetia peruviana</i> ("Chapéu-de-Napoleão")	Mun. Itaguaí, Km 32	25.2.93	4919	230	25.2.93	23,5	Adoeceu+++	11h56min	5 dias	-	5 dias 12h
	"	11.2.93	4925	153	11.2.93	9,8	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	14.11.92	4926	143	14.11.92	20,5	Morreu	6h30min	10h30min	17h	-
	"	25.1.93	4996	152	25.1.93	5,0	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	3.2.93	5201	175	3.2.93	10,0	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	24.1.95	5204	164	24.1.95	15,3	Morreu	1h47min	2h34min	4h21min	-
	"	8.6.93	5206	162	8.6.93	30,6	Adoeceu +(+)	5h15	3 dias	-	3 dias 6h
	"	16.2.95	5209	132	16.2.95	14,4	Morreu	2h25min	30min	2h55min	-
	"	14.2.95	5211	155	14.2.95	10,0	Adoeceu (+)	8h49min	10h	-	18h49min
	"	14.2.95	5212	123	14.2.95	20,0	Adoeceu ++	9h00min	3 dias 3h	-	3 dias 12h
	"	11.1.95	5221	141	11.1.95	20,0	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	9.1.95	5224	182	9.1.95	10,0	Adoeceu+	17h	9h	-	26h
"	16.2.95	5227	171	16.2.95	15,3	Adoeceu ++	1h45min	2 dias 5h35min	-	2 dias 7h	

Quadro 1 (cont.). Intoxicação experimental por algumas plantas ornamentais em bovinos. Delineamento dos experimentos

Família, Gênero e espécie (Nome popular)	Planta		Bovino		Administração		Desfecho	Início dos sintomas após o início da administração da planta	Evolução	Morte após o início da administração da planta	Recuperação após o início da administração da planta
	Procedência	Data da coleta	Nº (SAP)	Peso kg	Data	Dose g/kg					
Euphorbiaceae											
<i>Codiaeum</i> sp. ("Croton")	Mun. Itaguaí, UFRRJ	7.2.93	4919	230	8.2.93	20,0	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	11.2.93	5201	175	11.2.93	20,0	Sem sintomas	-	-	-	-
<i>Euphorbia cotinifolia</i> ("Aiapana", "maleteira")	Mun. Paulo de Frontin	23.4.92	4923	176	24.4.92	10,0	Sem sintomas	-	-	-	-
	Mun. Mendes	19.4.92	4925	139	20.4.92	11,4	Adoeceu +	4h25min	2 dias 12h	-	2 dias 16h
	Mun. Paulo de Frontin	7.3.95	5211	172	7.3.95	30,0	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	7.3.95	5227	186	7.3.95	19,4	Sem sintomas	-	-	-	-
<i>Euphorbia pulcherrima</i> ("Bico-de-papagaio")	Mun. Itaguaí, UFRRJ	16.5.92	4919	187	16.5.92	15,8	Adoeceu +(+)	21h45min	3 dias	-	4 dias
	Mun. Mendes	25.5.92	4925	139	25.5.92	16,4	Adoeceu +++	19h45min	7 dias	-	8 dias
	Mun. Itaguaí, Sítio Poranga	3.3.93	4996	132	3.3.93	30,0	Adoeceu +++	21h20min	8 dias	-	9 dias
<i>Euphorbia tirucalli</i> ("Avelós")	Mun. Itaguaí, UFRRJ	14.1.93	4919	232	14.1.93	21,5	Adoeceu (+)	12h14min	13h21min	-	1 dia
	"	2.10.92	4926	143	2.10.92	21,0	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	1.2.95	5226	217	1.2.95	30,0	Sem sintomas	-	-	-	-
Solanaceae											
<i>Datura arborea</i> ("Trombeteira")	Mun. Itaguaí, Sítio Poranga	1.6.92	4919	187	1.6.92	23,0	Adoeceu +	50min	3 dias	-	3 dias
	"	18.5.92	4927	131	18.5.92	23,3	Adoeceu +	15min	5 dias	-	5 dias
	"	3.3.93	5201	165	3.3.93	40,0	Adoeceu ++	35min	6 dias	-	6 dias
Araceae											
<i>Colocasia antiquorum</i> ("Orelha-de-elefanta")	Mun. Itaguaí, UFRRJ	9.10.92	4926	143	9.10.92	4,0	Adoeceu ++	Imediato	8 dias	-	8 dias
	"	10.10.92	4927 (26149)	146	10.10.92	6,8	Adoeceu +	Imediato	8h05min, sacrificado	8h05min	-
	"	24.8.95	5224	223	24.8.95	5,9	Adoeceu ++	Imediato	7 dias	-	7 dias
	"	24.8.95	5227	217	24.8.95	0,9	Adoeceu +	Imediato	5h16min	-	5h16min
<i>Scindapsus aureus</i> (= <i>Epipremnum aureum</i> ) ("Jibóia", "jibóia-dourada")	Mun. Itaguaí, UFRRJ	25.8.95	5225	140	24.8.95	40,0	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	24.8.95	5226	317	25.8.95	32,0	Sem sintomas	-	-	-	-
<i>Monstera deliciosa</i> ("Costela-de-Adão")	Mun. Itaguaí, UFRRJ	16.5.92	4925	139	16.5.92	16,5	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	6.6.92	4926	127	6.6.92	26,0	Sem sintomas	-	-	-	-

Quadro 1 (cont.). Intoxicação experimental por algumas plantas ornamentais em bovinos. Delineamento dos experimentos

Planta		Bovino		Administração		Desfecho	Início dos sintomas após o início da administração da planta	Evolução	Morte após o início da administração da planta	Recuperação após o início da administração da planta	
Família, Gênero e espécie (Nome popular)	Procedência	Data da coleta	Nº (SAP)	Peso kg	Data						Dose g/kg
<i>Philodendron hastatum</i> ("Filodendron")	Mun. Itaguaí, UFRRJ	16.5.92	4926	127	16.5.92	18,9	Sem sintomas	-	-	-	
	"	6.6.92	4927	131	6.6.92	11,7	Sem sintomas	-	-	-	
<i>Philodendron selloum</i> (= <i>P. sellowii</i> ) ("Banana-de-macaco")	Mun. Paulo de Frontin	18.11.92	4925	142	19.11.92	0,0	-	-	-	-	
	"	18.11.92	4996	120	19.11.92	0,0	-	-	-	-	
<i>Dieffenbachia picta</i> ("Comigo-ninguém-pode")	Mun. Itaguaí, UFRRJ	24.8.95	5223	283	24.8.95	3,7	Adoeceu ++	Imediato	7 dias	-	7 dias
	"	25.8.95	5228	198	25.8.95	4,8	Adoeceu ++	Imediato	7 dias	-	7 dias
Ericaceae <i>Rhododendron ledifolium</i> ("Azaléia")	Mun. Itaguaí	20.1.93	4925	168	22.1.93	5,0	Adoeceu ++	17h03min	2 dias e meio	-	3 dias e meio
	"	8.2.93	4996	149	8.2.93	10,0	Adoeceu++	5h06min	4 dias	-	4 dias 6h
	"	20.1.93	5201	175	20.1.93	2,5	Adoeceu +	23h18min	1 dia 6h	-	2 dias 6h
	"	21.1.93	5202	208	21.1.93	2,5	Adoeceu +	22h42min	2 dias	-	3 dias
	"	13.2.93	5203	203	13.2.93	20,0	Adoeceu +++	6h37min	6 dias	-	6 dias 6h
<i>Rhododendron indicum</i> ("Azaléia")	Mun. Resende, Distr. Real	26.7.93	4919	247	27.7.93	7,8	Adoeceu +	7h20min	1 dia 16h	-	2 dias
	"	26.7.93	5205	155	29.7.93	29,4	Morreu	16h20min	16 dias 12h	17 dias 8h	-
	"	17.1.95	5206	205	18.1.95	29,0	Adoeceu +++	13h35min	7 dias 12h	-	8 dias
	"	17.1.95	5209	139	18.1.95	20,0	Adoeceu +++	14h11min	6 dias 12h	-	7 dias
	"	17.1.95	5224	169	18.1.95	5,0	Adoeceu ++	15h07min	31h	-	46h
	"	17.1.95	5226	240	18.1.95	2,5	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	17.1.95	5227	167	18.1.95	10,0	Adoeceu ++(+)	16h58min	4 dias	-	5 dias
Malvaceae <i>Malva viscus arboreus</i> ("Papoula", "graxa-de-estudante", "chupetinha")	Mun. Itaguaí, UFRRJ	24.8.95	5211	196	24.8.95	40,8	Sem sintomas	-	-	-	-
	"	24.8.95	5212	182	24.8.95	20,0	Sem sintomas	-	-	-	-

<sup>a</sup> (+) Sintomas discretos, + leves, ++(+)+ leves a moderados, ++ moderados, +++(+)+ moderados a acentuados, +++ acentuados.

importante foi o edema de todas as camadas da parede do rúmen, acompanhado de infiltrados polimorfonucleares.

*Nerium oleander* causou graves perturbações cardíacas sob forma de arritmia e ainda acentuadas alterações digestivas sob forma de forte diarreia. Um dos 3 animais que morreu (Bov. 5207), adicionalmente eliminou por via digestiva grande quantidade de cilindros de sangue coagulado que o levou à morte devido a acentuada anemia. Dois outros bovinos que se recuperaram (Bov. 5223, 5206) também eliminaram sangue junto às fezes, mas em quantidades bem menores. Os achados de necropsia consistiram principalmente em hemorragias em serosas, mucosas, no endo e epicárdio, e especialmente no aparelho digestivo. A necropsia do Bovino 5207 revelou que a origem da perda da grande quantidade de sangue foram hemorragias por diapedese, principalmente a nível do cólon inicial. A alteração histológica mais importante foi a necrose das fibras cardíacas, mas bem evidente e extensa somente em um dos três bovinos (Bov. 5208). No Bovino 5207 eram poucos e pequenos focos de necrose e no Bovino 5206 havia somente lesão incipiente de necrose, que além disto era muito limitada, afetando só células isoladas ou pequenos grupos, e discreta.

*Thevetia peruviana* também causou, semelhante a *N. oleander*, perturbações cardíacas sob forma de arritmias e digestivas sob forma de diarreia. Nos três bovinos que morreram (Bov. 4926, 5204, 5209), a evolução da intoxicação foi muito rápida, ao contrário do que ocorreu com *N. oleander*. Enquanto um desses bovinos (Bov. 4926) teve diarreia muito acentuada, que poderia explicar a morte, os outros dois bovinos (Bov. 5204, 5209) não manifestaram sintomas que explicassem a ocorrência da morte. Não foram constatadas alterações à necropsia com exceção de um bovino, o que teve diarreia (Bov. 4926), em que o conteúdo do rúmen estava com cheiro pútrido e o de todo intestino líquido. Não houve lesões histológicas constantes. Um bovino (Bov. 4926) tinha nos pró-ventrículos edema acentuado à altura do epitélio com seu desprendimento, um segundo (Bov. 5204) tinha vacuolização difusa do fígado em grau moderado e o terceiro (Bov. 5209) praticamente não tinha lesões.

#### Euphorbiaceae

Das quatro plantas desta família administradas a bovinos, somente *Euphorbia pulcherrima* causou grave intoxicação caracterizada por grande debilidade, porém os animais se recuperaram.

Um dos animais que recebeu *Euphorbia tirucalli* (Bov. 4919), teve moderado edema submandibular durante um dia.

#### Solanaceae

A única planta desta família submetida a experimentação, *Datura arborea*, causou intoxicação com sintomas observados na intoxicação por atropina: os animais tinham focinho seco, prisão de ventre com eliminação de poucas

fezes ressequidas, abdomen volumoso e excitabilidade aumentada. Mas todos os animais se recuperaram ao cabo de poucos dias.

#### Araceae

Nem todos os representantes da família Araceae causaram intoxicação. *Colocasia antiquorum* ("orelha-de-elefante") e *Dieffenbachia picta* ("comigo-ninguém-pode") causaram um quadro clínico marcado por sialorréia e edemas sublingual e submandibular. Um dos 3 animais que receberam *Colocasia antiquorum* (Bov. 4926) teve adicionalmente desprendimento do epitélio da língua em diversas áreas. Um outro foi sacrificado (Bov. 4927) no mesmo dia da administração da planta para a verificação das lesões.

As alterações macroscópicas consistiram em leve edema da face inferior da língua, leve edema difuso da parede do rúmen, leve a moderado edema difuso da parede do retículo, leve aumento dos linfonodos mesentéricos. Exames histopatológicos revelaram edema, de leve a acentuado, nas estruturas acima mencionadas, sem a presença de cristais de oxalato.

Não foi possível fazer com que os bovinos engulissem as folhas de *Philodendron selloum*, coletadas no município de Paulo de Frontin; os animais mastigavam as folhas salivando muito sem as engolir.

#### Ericaceae

*Rhododendron* spp., as únicas plantas desta família submetidas a experimentação em bovinos, causaram quadro de intoxicação grave. A sintomatologia consistiu principalmente em regurgitamento sem ou com vômito, sialorréia, cólicas, diarreia e perturbações de equilíbrio. Os achados de necropsia no único animal que morreu (Bov. 5205) foram negativos. Exames histopatológicos não revelaram alterações dignas de nota.

#### Malvaceae

A única planta desta família submetida a experimentação em 2 bovinos, *Malvaviscus arboreus*, não causou sintomas de intoxicação em nossos experimentos.

#### RESUMO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

##### *Allamanda cathartica*

*Bovino 5202*, recebeu em 1.2.94, das 10:20 às 11:45h, 4180 g (20 g/kg) das folhas frescas de *Allamanda cathartica*. Mostrou leve falta de apetite, atonia ruminal, inquietação (cólica), durante um dia.

*Bovino 5204*, recebeu em 11.1.95, das 09:11 às 11:11h, 3400 g (20 g/kg) das folhas frescas de *A. cathartica*. No 2º dia do experimento apresentou anorexia e atonia ruminal. Durante o 3º dia comeu pouco, hipomotilidade ruminal; poucas fezes ressequidas. No 4º dia de manhã recuperado.

*Bovino 5206*, recebeu em 4.2.94, das 14:20 às 16:12h, 5460 g (30 g/kg) das folhas frescas de *A. cathartica*. Mostrou leve falta de apetite, hipomotilidade e atonia ruminais, fezes ressequidas, leve arritmia cardíaca, durante dois dias.

*Bovino 5221*, recebeu em 30.1.95 das 09:15 às 11:32h, 4680 g (30 g/kg) das folhas frescas de *A. cathartica*. Os primeiros sintomas, observados já no primeiro dia, foram anorexia, leve timpanismo, filete de saliva escorria pela boca. Às 14:05h urina de coloração laranja acastanhada,

que, deixada ao ambiente, após duas horas estava preta. Às 19:45h rúmen sem movimentos. Em decúbito esternal. Mudava frequentemente de posição: ora ficava com o pescoço para frente com o queixo encostado no chão, ora com a cabeça encostada no flanco. Mudava frequentemente a posição dos membros, às vezes esticadas lateralmente, às vezes sob o corpo. Gemia. Às 21:41h levantou-se. Abdômen volumoso sem timpanismo. Às 22:00h em decúbito esternal, mudando frequentemente de posição, às vezes até ficava em decúbito lateral, mas logo voltava ao decúbito esternal, em seguida ficava em pé. Continuou inquieto nas próximas horas. No 2º dia, às 05:25h: T 38,2º, FC 120, FR 20, Rú 1/5 discreto<sup>8</sup>. Continuou inquieto. Às 11:00h levantou-se com dificuldade, bebeu bastante água. Depois ficou em decúbito esternal, rangia os dentes, mugia, inquieto, mudava de posição (cólica). Às 13:38h levantou-se com dificuldade; com andar incoordenado, quase caindo. Logo em seguida ficou em decúbito esternal. Superfície do corpo fria. Às 17:37h tentou se levantar, sem sucesso. Ficou em decúbito esternal, em posição auscultatória. Às 17:56h em decúbito lateral, com respiração difícil. Timpanismo moderado. T 36,2º, FC 160, FR 40. Às 18:17h timpanismo aliviado por passagem de sonda. Ficou em decúbito esternal apoiado na parede, com pescoço em "S". Leves tremores musculares, leves movimentos de pedalagem, respiração forçada com boca aberta. Às 19:44h morreu. *Achados de necropsia*: rúmen bastante volumoso, repleto de conteúdo de consistência normal com cheiro lembrando silagem. Ainda se percebiam fragmentos de folhas da planta administrada. Sob a serosa do rúmen, partindo da região cárdica, e toda região adjacente, sobretudo nos ligamentos, acentuado edema gelatinoso de coloração citrina, com espessura de até 3cm. Parede do rúmen com edema acentuado, do retículo com edema moderado. O epitélio se desprendia com facilidade, deixando perceber a própria levemente avermelhada em algumas áreas. Abomaso sem lesões. Mucosa do duodeno, jejuno, íleo e ceco moderadamente avermelhada. Cólon com escasso conteúdo ressequido com um pouco de muco branco e às vezes embebido por pequena quantidade de sangue. Hemorragias subendocárdicas bastante extensas no ventrículo esquerdo. *Exames histopatológicos* (SAP 27617-18) revelaram no rúmen edema acentuado da própria, submucosa, muscular e serosa, com infiltrados de polimorfonucleares, últimos especialmente na própria, com separação de extensas áreas do epitélio da própria. Em alguns pontos edema entre as células epiteliais, às vezes com formação de espaços preenchidos por líquido e polimorfonucleares com separação da parte superior do epitélio da camada germinativa; no fígado tumefação difusa dos hepatócitos, parte com citoplasma de aspecto espumoso. Alguns poucos hepatócitos com citoplasma mais eosinófilo e núcleo com cromatina condensada; medula do rim com moderada congestão, as células epiteliais de alguns túbulos uriníferos no córtex necróticas (citoplasma mais vermelho, núcleo picnótico ou em cariorrexia).

*Bovino 5222*, recebeu em 29.11.94, das 09:05 às 13:54h, 5850 g (30 g/kg) das folhas frescas de *A. cathartica*. Às 17:46h do 1º dia foi encontrado em decúbito lateral. Tocado, levantou-se. Inquieto, deitando e levantando-se; atonia ruminal. Às 18:30 eliminou pequena quantidade de urina escura. Às 22:10h com dispnéia, eliminação de fezes líquidas. No 2º dia, às 00:28h em decúbito esternal, com respiração ofegante. T 37,6º, FC 180, FR 16, Rú -. Às 02:50h morto. *Achados de necropsia*: edema acentuado sob a serosa do rúmen, nas áreas adjacentes ao sulco ruminal, da inserção do baço, entre o rúmen e retículo, retículo e omaso, omaso e abomaso. Papilas do rúmen avermelhadas. Mucosa do abomaso e duodeno levemente avermelhadas. Vascularização evidente de algumas áreas do jejuno e íleo. Pequenas áreas na mucosa do ceco e da porção inicial do cólon ascendente com petéquias e equimoses. Hemorragias subendocárdicas do ventrículo esquerdo. *Exames histopatológicos* (SAP 27601-02) revelaram na parede do rúmen edema acentuado da própria, submucosa, muscular e serosa, acompanhado de infiltrados polimorfonucleares leves a moderados. Moderada congestão das partes superiores da própria, onde havia maior número de polimorfonucleares. Em extensas áreas separação do epitélio da própria. No fígado observaram-se poucos focos de necrose paracentral infiltrados por polimorfonucleares;

hepatócitos isolados ou em pequenos grupos com citoplasma mais eosinófilo e cromatina nuclear condensada. No córtex do rim leve congestão. Moderada congestão da medular renal, pequena quantidade de albumina nos espaços de Bownan e na luz dos túbulos uriníferos do córtex. No baço havia cariorrexia das células linfóides dos folículos, de distribuição difusa e intensidade leve, e congestão moderada.

*Bovino 5223*, recebeu em 25.1.95, das 10:05 às 11:39h, 4560 g (20 g/kg) das folhas frescas de *A. cathartica*. No 2º dia leve falta de apetite, fezes levemente ressequidas, hipomotilidade ruminal. No 3º dia na parte da manhã os mesmos sintomas. À tarde recuperado. No 1º dia do experimento às 18:00h urina de cor laranja escura. Deixada exposta ao ambiente, após 3 horas estava preta.

#### *Nerium oleander*

*Bovino 5202*, recebeu em 3.2.93, das 11:00 às 11:05h, 20,8 g (0,1 g/kg) das folhas frescas de *Nerium oleander*. No 2º dia à tarde diarreia com fezes líquidas, à noite com arritmia cardíaca. No 3º dia fezes líquidas fétidas, nítida arritmia com longos intervalos entre sons, apatia, extremidades e superfície do corpo frias, retração dos globos oculares, focinho seco. Pequena diminuição do apetite. No 4º dia não defecou, os outros sintomas menos acentuados. No 5º dia ainda um pouco apático; à noite recuperado.

*Bovino 5204*, recebeu em 17.7.93, das 21:13 às 21:18h, 29,25 g (0,25 g/kg) das folhas frescas de *N. oleander*. No 2º e 3º dia o animal teve leve arritmia e durante o 2º ao 6º dia leve bradicardia. No 4º dia com diarreia líquida de coloração verde parda com muco; neste mesmo dia mostrou anorexia. Durante o 2º ao 6º dia estava apático. No final do 6º dia recuperado.

*Bovino 5206*, recebeu em 14.2.95, das 19:10 às 19:15h, 50,25 g (0,25 g/kg) das folhas frescas de *N. oleander*. O primeiro sintoma, observado no 2º dia, na parte da manhã, foi anorexia. À tarde FC normal com leve arritmia: à cada 15 segundos faltava uma batida, seguida por 2 batidas rápidas. Rúmen quase parado. À noite arritmia mais acentuada: à cada 2 ou 3 batidas normais havia 2 batidas rápidas. Fezes sem alterações. No 3º dia na parte da manhã FC 56, após leve movimentação FC 88. Superfície do corpo fria, anorexia. À tarde FC irregular; eliminação de fezes com muito muco transparente. Rúmen quase parado. FR 24, FC 84; após cada 3, 4 ou 5 batimentos lentos seguiam-se 2 ou 3 rápidos. No 4º dia de manhã o animal estava em pé. Fezes líquidas com muito muco e fibrina e um pouco de sangue. FC 68 com sopro forte, às vezes frequência cardíaca até 120 por períodos curtos. Anorexia. Às 13:33h FC 180, FR 24. Às 14:01h caiu de lado, fez movimentos intermitentes de pedalagem e às 14:03h estava morto. *Achados de necropsia*: nos dois últimos metros do jejuno mucosa leve a moderadamente congesta; áreas com minúsculas petéquias. Ceco com pouco conteúdo líquido. Presença de pequena quantidade de petéquias acompanhando o sulco coronário longitudinal. *Exames histopatológicos* (SAP 27663-64) revelaram na mucosa do jejuno leve congestão; no coração presença de fibras cardíacas isoladas ou em pequenos grupos com o citoplasma bem eosinófilo e a cromatina nuclear condensada; no fígado número variável de hepatócitos com citoplasma mais vermelho e a cromatina nuclear condensada; no rim no espaço glomerular presença de pequena quantidade de albumina, na luz de túbulos uriníferos do córtex em quantidade moderada.

*Bovino 5207*, recebeu em 15.6.93, das 11:35 às 11:40h, 77,5 g (0,5 g/kg) das folhas frescas de *N. oleander*. A partir do 2º dia bradicardia e arritmia caracterizada por pausa, de duração variável, após cada 2ª, 3ª ou 5ª batida, que eram fortes; a arritmia ficou muito acentuada no fim do dia. Engurgitamento da jugular. Animal apático, extremidades e superfície do corpo frias; anorexia, globos oculares retraídos. No 3º dia arritmia cardíaca acentuada, fezes líquidas, focinho seco; quase sempre em decúbito esternal com a cabeça encostada no flanco. No 4º dia fezes líquidas com muito muco e mais tarde sangue sob forma de estrias, e em seguida ainda com pequenos coágulos sanguíneos. Mais tarde eliminou sangue vivo líquido e coágulos sanguíneos de coloração vermelha viva. Corrento sanguinolento pelas narinas. Continuou sempre com arritmia, FC 48 a 100, mas com pausas curtas após cada 2 a 5 batidas. No 5º e 6º dia eliminou diversas vezes junto com um pouco de fezes líquidas, grande quantidade de sangue coagulado de cor vermelha viva sob a forma de cilindros, com 1 a 2 cm de diâmetro e 10 a 20 cm de comprimento. As

<sup>8</sup>T= Temperatura em °C. P= frequência cardíaca por minuto. R= frequência respiratória por minuto. Ru x/x= movimentos do rúmen em minutos.

mucosas ficaram acentuadamente anêmicas e apareceu um leve edema submandibular. O animal ficava a maior parte do tempo em decúbito esternal; às vezes levantava e bebia água. Não comia. Batimentos cardíacos quase normalizados. No 7º dia amanheceu morto. *Achados de necropsia*: presença de petéquias, equimoses e sufusões na pleura parietal, na mucosa dos seios da cabeça e na mucosa da traquéia, na parede da vesícula biliar, no epicárdio, endocárdio, na serosa do baço, na serosa da parede do rúmen, do retículo e do omaso, na serosa do jejuno, na mucosa do abomaso, duodeno, jejuno. Na passagem do omaso para o abomaso havia um coágulo do tamanho de um polegar, aderido à parede, na mucosa do duodeno e na dos dois primeiros terços do jejuno havia massas fibrinosas ou coágulos sanguíneos com 1 a 3 cm de comprimento aderidos à mucosa, e que podiam ser retirados com facilidade. O conteúdo da parte inicial do jejuno tinha coloração rósea, da parte mediana rósea intensa e da parte final castanha escura. No cólon, mucosa com áreas espessadas e presença de pequenos coágulos com tamanho de cabeça de alfinete aderidos, na sua luz presença de cilindros de coágulo sanguíneo vermelho medindo 2 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento. Toda carcaça pálida. *Exames histopatológicos* (SAP 26538-44) revelaram no miocárdio pequena quantidade de focos de necrose de coagulação de fibras cardíacas, com presença de macrófagos. Presença de hemorragias na mucosa do omaso, abomaso, duodeno e jejuno, no endocárdio, miocárdio e epicárdio.

*Bovino 5208*, recebeu em 14.7.93, das 11:50 às 11:54 h, 77,5 g (0,5 g/kg) das folhas frescas de *N. oleander*. No 2º dia o animal estava apático, ficando deitado em decúbito esternal durante o exame. No fim deste dia curtos períodos de alterações na frequência e no ritmo dos batimentos cardíacos; anorexia, atonia do rúmen, focinho seco. No 3º dia hipotermia, excicose, anorexia, globos oculares retraídos. Arritmia cardíaca; após uma série de batimentos pausa de até 8 segundos, em seguida sequência rápida de batimentos de intensidade variável. No fim do dia em decúbito lateral, com hipotermia, extremidades e superfície do corpo frias. Com sinais de cólica. No 4º dia de manhã em decúbito esternal; eliminou fezes líquidas fétidas. Taquicardia com sons pouco definidos e de intensidade fraca, arritmia. Ficou em decúbito lateral e morreu ainda na parte da manhã. *Achados de necropsia*: havia petéquias no omento maior, equimoses na serosa da vesícula biliar, sufusões na serosa do baço, extensas hemorragias no endocárdio do ventrículo esquerdo, petéquias e equimoses nos músculos supra-espinhosos e triceps braquiais; na mucosa do abomaso e da parte final do jejuno numerosas petéquias; conteúdo do ceco e cólon semi-líquido, de coloração castanha, com petéquias em algumas áreas; no cólon e reto presença de minúsculos coágulos sanguíneos, alguns aderidos à parede. - *Exames histopatológicos* (SAP 26848-57) revelaram extensas hemorragias no endo e miocárdio e necrose de coagulação de fibras cardíacas afetando áreas, focos ou células individuais (apoptose). No fígado havia leve dissociação das células hepáticas e edema dos espaços de Disse. Na mucosa da vesícula biliar constatou-se a presença de hemorragias e úlceras.

*Bovino 5223*, recebeu em 9.1.95, das 13:38 às 13:45 h, 58,75 g (0,25 g/kg) das folhas frescas de *N. oleander*. No 2º dia de manhã com arritmia: após cada 1, 2 ou 3 batidas uma pausa. Rúmen parado. Abdômen volumoso. Focinho seco. Andar lerdo cambaleante. Dispneia leve. À tarde arritmia mais acentuada, com batimentos fortes. Animal inquieto, pisando no mesmo local. No fim do dia fezes líquidas com odor fétido. Gemidos baixos, às vezes levava a cabeça ao flanco (cólica). No 3º dia permaneceu o dia todo em decúbito esternal-abdominal, frequentemente com a cabeça encostada no flanco. Fezes semi-líquidas até líquidas com mau cheiro. Atonia ruminal. Retração dos globos oculares. FC variava de 40 a 100, batimentos fortes, às vezes (1 vez por minuto) faltava uma batida. No 4º dia na parte de manhã inicialmente em pé, depois em decúbito esternal. Atonia ruminal. Fezes líquidas. Retração dos globos oculares. Frequência cardíaca variável entre 60 e 72, fortes, às vezes faltava uma batida. No 5º dia em pé, fezes líquidas; começou a comer devagar. Dispneia, FR 36. Às 7:53 h de repente caiu, ficou em decúbito lateral, revirou os olhos, esticou os membros; após 5 minutos assumiu o decúbito esternal. Às 8:02 h ficou em pé. FC irregular (arritmia), batimentos fortes. Rúmen funcionava moderadamente. No 6º dia eliminou fezes semi-líquidas com presença de coágulos de sangue vivo, diversas vezes durante o dia.

Anorexia bastante acentuada durante o dia todo. Rúmen funcionava fracamente. Arritmia com falhas após cada 1 a 3 batidas. Durante o dia em pé ou em decúbito esternal. No 7º dia durante o dia eliminou fezes de consistência normal com um pouco de sangue coagulado. Comia bem, ruminava. Rúmen com movimentos quase normais. Coração com raras falhas. No 8º dia na parte da manhã com os mesmos sintomas. À noite recuperado.

*Bovino 5226*, recebeu em 29.11.94, das 9:12 às 9:20 h, 48 g (0,25 g/kg) das folhas frescas de *N. oleander*. Já no primeiro dia apresentou arritmia (intervalo entre cada 5 batimentos). No 2º dia anorexia acentuada. Fezes semi-líquidas. Apatia. FC 64 com arritmia: após cada 2 a 6 batimentos uma pausa. Rú 1/5 fracos. No 3º dia com diarreia aquosa fétida. Arritmia como no dia anterior. Magro. Pêlos arrepiados. Andar lerdo. No 4º dia com diarreia menos acentuada. Globos oculares levemente retraídos. Arritmia: após cada 2 ou às vezes 1 batida, pausa, na parte da manhã; à tarde, pausa após 4, 6 ou 14 batidas. Comia às vezes. Rúmen ativo. Durante o 5º dia fezes cada vez mais com consistência normal. Apetite e movimentos ruminais normais. Na parte da manhã arritmia: após cada 3 ou 4 batidas pausa. À noite sem arritmia. Recuperado.

#### *Thevetia peruviana*

*Bovino 4919*, recebeu em 25.2.93, das 18:56 às 20:49 h, 5405 g (23,5 g/kg) das folhas frescas de *T. peruviana*. No 2º dia do experimento com leves tremores musculares em diversas partes do corpo; superfície do corpo fria; pelos arrepiados; hipotermia (37,1º); leve sialorréia. Fezes líquidas de cor verde azeitona com presença de fibrina e muco, fétidas. Animal às vezes com tenesmo. Arritmia cardíaca, que durante o dia foi se acentuando, com ausência de sons (falhas) após cada 3 a 8 batidas, sons extras, taquicardia (FC 144), presença de sopro, arritmia acentuada. Globos oculares retraídos; animal inquieto, pisando no mesmo local (cólica). Excicose. Durante o dia às vezes comia, bebia muita água. Às vezes em pé, às vezes em decúbito esternal. No 3º dia os mesmos sintomas, mas no final do dia já menos acentuados. No 4º dia temperatura normal, fezes semipastosas, comia bem; coração com arritmia moderada, com fases de taquicardia, tendência a normalização. No 5º dia leve arritmia cardíaca ocasional; fezes ainda semipastosas. No 6º dia fezes quase normais; leves variações na intensidade dos batimentos cardíacos. No 7º dia recuperado.

*Bovino 4926*, recebeu em 14.11.92, das 15:30 às 17:00 h, 2931 g (20,5 g/kg) das folhas frescas de *T. peruviana*. O primeiro sintoma observado foi diarreia líquida. Em seguida foram observados anorexia, atonia ruminal. No 2º dia diarreia líquida, taquicardia acentuada, hipotermia, retração dos globos oculares, excicose, decúbito lateral e morte. *Achados de necropsia*: rúmen preenchido por conteúdo com cheiro putrefeito, no qual ainda se reconheciam fragmentos da planta. O conteúdo do intestino delgado, ceco e cólon estava líquido, sua mucosa sem alterações. O fígado era, ao corte, mais claro. *Exames histopatológicos* (SAP 26204-07) revelaram alterações principalmente nos proventrículos. Tanto no rúmen, como retículo e omaso, havia no estrato espinoso espaços entre as células epiteliais, na sua maior parte preenchidos por polimorfonucleares; no rúmen, e no retículo em menor grau, estes espaços em algumas regiões confluíam havendo a formação de fendas horizontais com separação da parte superior do epitélio. No córtex renal havia pequena quantidade de material protéico filtrado nos túbulos uriníferos, algumas células epiteliais apresentando o seu citoplasma levemente granular. No baço havia necrose com imagens de cariorrexis das células linfóides dos folículos, de distribuição difusa e em grau leve a moderado.

*Bovino 5204*, recebeu em 24.1.95, das 10:34 às 12:21, 2509 g (15,3 g/kg) das folhas frescas de *T. peruviana*. Administração interrompida, pois o animal não engolia mais a planta. Suspeita de obstrução do esôfago. Passagem de sonda: esôfago livre. De repente o animal se debateu, caiu e morreu em questão de minutos. *Achados de necropsia*: no esôfago não havia conteúdo de qualquer espécie. No endocárdio do ventrículo esquerdo presença de algumas equimoses. *Exames histopatológicos* (SAP 27614-15) revelaram no fígado vacuolização difusa moderada dos hepatócitos, com vacúolos de tamanho médio.

*Bovino 5206*, recebeu em 8.6.93, das 9:35 às 12:00 h, 4957 g (30,6 g/kg) das folhas frescas de *T. peruviana*. No dia da administração leves

alterações no ritmo e na intensidade dos batimentos cardíacos. No 2º e 3º dia fezes líquidas fétidas. Taquicardia. No 3º dia anorexia acentuada. No 4º dia comeu bem, fezes quase normais, coração quase normal. No 5º dia recuperado.

*Bovino 5209*, recebeu em 16.2.95, das 14:50 às 17:15 h, 1900 g (14,4 g/kg) das folhas frescas de *T. peruviana*. Administração interrompida, pois o animal não engolia mais a planta. Agitado, dando coices no abdômen. FC 180, FR 20. Em decúbito esternal. Mugidos baixos; ranger de dentes. Às 17:40 h levantou-se, correu poucos passos, caiu em decúbito lateral, com opistótono, tremores na região glútea, morte às 17:45 h. *Achados de necropsia*: no rúmen ainda partes da planta administrada reconhecíveis. Congestão acentuada de partes da mucosa do jejuno. *Exames histopatológicos* (SAP 27661-62) revelaram no fígado a presença de poucas células hepáticas isoladas ou em pequenos grupos com citoplasma bem eosinófilo e cromatina nuclear condensada.

*Bovino 5211*, recebeu em 14.2.95, das 10:46 às 11:14 h, 1550 g (10 g/kg) das folhas frescas de *T. peruviana*. No 2º dia de manhã fezes pastosas a líquidas, à tarde normais.

*Bovino 5212*, recebeu em 14.2.95, das 10:46 às 12:18 h, 2460 g (20 g/kg) das folhas frescas de *T. peruviana*. Durante 3 dias e meio teve anorexia e fezes líquidas. FC e FR sem alterações.

*Bovino 5224*, recebeu em 9.1.95, das 16:05 às 17:00 h, 1820 g (10 g/kg) das folhas frescas de *T. peruviana*. Só mostrou leve anorexia passageira.

*Bovino 5227*, recebeu em 16.2.95, das 11:00 às 12:45 h, 2616 g (15,3 g/kg) das folhas frescas de *T. peruviana*. Administração interrompida, pois o animal não engolia mais a planta. Anorexia. No 2º dia diarreia líquida, hipomotilidade ruminal. FC e FR sempre normais. No 3º dia recuperado.

#### *Euphorbia cotinifolia*

*Bovino 4925*, recebeu em 20.4.92, das 13:20 às 14:25 h, 1584 g (11,4 g/kg) das folhas frescas de *E. cotinifolia*. No mesmo dia da administração teve anorexia, sialorréia, pisava no mesmo local (cólica). No 2º e 3º dia só mostrou falta de apetite.

#### *Euphorbia pulcherrima*

*Bovino 4919*, recebeu em 16.5.92, das 10:45 às 11:45 h, 2954 g (15,8 g/kg) das folhas frescas de *E. pulcherrima*. Do 2º ao 4º dia com andar lerdado cambaleante, diminuição do apetite. No 4º dia ainda forte diarreia líquida. No 5º dia recuperado.

*Bovino 4925*, recebeu em 25.5.92, das 16:00 às 18:45 h, 2279 g (16,4 g/kg) das folhas frescas de *E. pulcherrima*. A partir do 2º dia com anorexia. A partir do 3º dia com lerdeza. A partir do 4º dia com andar desequilibrado. No 5º dia em decúbito lateral; colocado em pé, ficou um pouco, depois em decúbito esternal. Rúmen com funcionamento normal. Dado ração e capim na boca, comia devagar. Animal muito magro. Passou o 6º dia em decúbito esternal; comeu um pouco de capim dado na boca. No 7º dia colocado em pé, com instabilidade. Comeu capim dado na boca. À tarde começou a comer por si. No 8º dia em pé comendo capim. Sempre teve fezes normais. No início do 9º dia recuperado, embora muito magro.

*Bovino 4996*, recebeu em 3.3.93, das 9:30 às 11:00 h, 3960 g (30,0 g/kg) das folhas frescas de *E. pulcherrima*. A partir do 2º dia apático, comia muito pouco, fezes ressequidas, rúmen com funcionamento quase normal. No 5º dia com sialorréia. Fraco, desequilibrado, quase caindo. Sonolência. Às vezes com ranger de dentes. Quando em decúbito esternal, frequentemente com pescoço esticado para frente com a cabeça apoiada no chão. No 6º dia animal muito fraco. Em decúbito esternal, inclinado, com a cabeça encostada no flanco. Com sialorréia. Rúmen com funcionamento normal. Levantou por si. Comeu capim devagar. No 7º dia em pé comendo capim. Ranger de dentes. Fraco; andar desequilibrado. No 8º dia em pé, comia, rúmen normal, fezes normais. No 9º dia ainda com andar inseguro. No 10º dia recuperado, apesar de ainda muito magro.

#### *Datura arborea*

*Bovino 4919*, recebeu em 1.6.92, das 17:30 às 18:20 h, 4301 g (23,0 g/kg) das folhas frescas de *D. arborea*. Logo após a administração da planta

o animal mostrou dificuldade em pegar a ração e o capim. Assustava-se com facilidade (reações exageradas). Do 2º ao 4º dia comia regularmente a bem. Fezes ressequidas e poucas. No 2º dia às vezes levantava a cauda sem defecar. No 4º dia recuperado.

*Bovino 4927*, recebeu em 18.5.92, das 16:15 às 18:25 h, 3052 g (23,3 g/kg) das folhas frescas de *D. arborea*. Logo após a administração o animal se assustava com facilidade. Do 2º ao 5º dia comia bem. Fezes ressequidas. No 2º dia às vezes levantava a cauda sem defecar. Do 2º ao 4º dia focinho seco. No 4º e 5º dia abdômen volumoso e firme. No 6º dia recuperado.

*Bovino 5201*, recebeu em 3.3.93, das 10:12 às 11:57 h, 6600 g (40,0 g/kg) das folhas frescas de *D. arborea*. Logo após a administração o animal estava muito inquieto, fazia movimentos muito bruscos, dava coices na parede, dava voltas na baía, batia com os pés na barriga, apresentava reações de fuga, de alerta, espantava moscas com cabeçadas violentas; sempre comia ávidamente; urinava frequentemente pequenas quantidades; leve a moderado timpanismo. Após 3 horas esta hiperexcitabilidade foi diminuindo e no 2º dia de manhã (18 h após o início dos sintomas) só era leve. A partir do 2º dia abdômen volumoso e firme; eliminação de poucas fezes ressequidas sob forma de bolotas, tenesmo, focinho seco. Sempre comia bem. No 4º dia abdômen muito volumoso, simetricamente, firme. No 5º dia fezes normais; abdômen moderadamente aumentado. No 7º dia recuperado.

#### *Colocasia antiquorum*

*Bovino 4926*, recebeu em 9.10.92, das 14:58 às 15:57 h, aproximadamente 600 g (aprox. 4 g/kg) das folhas frescas de *Colocasia antiquorum*, com os talos. Durante a administração havia regurgitação, sialorréia e aparecimento de leve edema sublingual, das bochechas e dos lábios. Na hora seguinte à administração aumento progressivo da sialorréia e do edema sublingual, que ficou acentuado; aparecimento de respiração ruidosa, principalmente na inspiração, com narinas repuxadas, pescoço esticado para frente e forçando a musculatura abdominal. Durante a segunda hora após a administração da planta a respiração se normalizou. Devido ao edema sublingual o animal mantinha a boca meio aberta, a ponta da língua protrusa; sialorréia forte; às vezes tremores generalizados; às vezes sacudia a cabeça. Nas horas seguintes o animal continuou com os mesmos sintomas. Adicionalmente havia ainda edema submandibular e fases em que a respiração era forçada, com ronqueira. Nunca teve timpanismo. No 2º dia do experimento acentuado edema submandibular e sublingual com necrose superficial do epitélio da língua. Mau cheiro exalava pela boca. Ponta da língua às vezes protrusa. Respiração normal. Leves tremores ocasionais no trem posterior. Se interessava pela comida, mas não conseguia comer. Movimentos do rúmen normais. No 3º dia edema submandibular e sublingual moderado. Desprendimento do epitélio da língua em diversas áreas. Se interessava pela comida, mas não conseguia comer. Rúmen normal. Animal sempre esperto. No 4º dia com bastante sialorréia. No 5º dia desapareceram os edemas. O animal continuou não poder comer. No 7º dia comeu ração concentrada pela primeira vez, no 8º dia pela primeira vez comeu capim. No 9º dia comeu bem; considerado recuperado. Continuou durante o ato de ruminar com sialorréia ainda durante alguns dias. Emagreceu bastante.

*Bovino 4927* (SAP 26149), recebeu em 10.10.92, das 8:25 às 9:25 h, 993 g (6,8 g/kg) das folhas frescas de *C. antiquorum*, com os talos. Durante a administração houve regurgitamento de suco de rúmen, apareceu leve edema dos lábios e o animal mostrou sialorréia filamentososa forte. Às 16:30 h o animal foi sacrificado para o estudo das lesões. *Achados de necropsia*: leve edema sublingual, leve a moderado edema difuso da parede do rúmen e do retículo. *Exames histopatológicos* (SAP 26149) não revelaram além dos edemas supramencionados outras lesões significativas. Não foi verificada a presença de cristais de oxalato nas mucosas do aparelho digestivo.

*Bovino 5224*, recebeu em 24.8.95, das 15:11 às 15:20 h, 1315 g (5,9 g/kg) das folhas frescas de *C. antiquorum*, com os talos. Não foi possível dar continuidade a administração da planta, pois o animal relutava e apresentava respiração ruidosa (roncava). Tinha sialorréia intensa. Às 16:00 h a respiração era menos ruidosa, porém a salivagem continuou intensa; o animal ficava frequentemente com o dorso arqueado, urinando peque-

nas quantidades. Leve edema sublingual. Às 19:15 h a respiração já não era mais ruidosa. Não comia. No 2º dia do experimento o animal continuou com acentuado edema submandibular e com sialorréia moderada, ia ao cocho, mas não comia. No 3º dia estava com edema submandibular moderado, e com sialorréia leve; à noite comeu capim. No 4º dia estava sem edema submandibular, com sialorréia leve, comia bem. Ainda teve leve sialorréia até o 8º dia do experimento. Fezes, temperatura, movimentos do rúmen, frequências cardíaca e respiratória sempre tiveram normais.

*Bovino 5227*, recebeu em 24.8.95, das 10:09 às 10:21 h, 195 g (0,9 g/kg) das folhas frescas de *C. antiquorum*, com os talos. O animal mastigava muito as folhas, salivava, sem engolir a planta. Foi interrompida a administração. Às 10:27 h, quando foi colocado capim picado no cocho, o animal mexia o capim, queria mas aparentemente não conseguia pegá-lo. Examinada a boca, sem edemas. Até as 16:00 h diversas vezes se interessava pelo capim, mas não comia; sempre com sialorréia. Às 16:00 h começou a comer bem, sem sialorréia. Fezes, temperatura, movimentos do rúmen, frequências cardíaca e respiratória sempre tiveram normais.

#### *Philodendron sellowii* (= *P. sellowii*)

Em 19.11.92 as folhas de *P. sellowii*, com os talos, foram administradas aos bovinos 4925 e 4996. Os animais mastigaram as folhas espumando sem as engolir. Em virtude disto, a administração foi interrompida após aproximadamente 10 minutos. Dado capim 5 minutos mais tarde, um (Bov. 4925) comia o capim devagar, mastigando muito, o outro (Bov. 4996) começou a comer, mas logo desistiu. Examinada a boca, não se verificaram lesões. Trinta minutos mais tarde, dado capim de novo, ambos o comeram normalmente.

#### *Dieffenbachia picta*

*Bovino 5223*, recebeu em 24.8.95, das 16:40 às 17:30 h, 1047 g (3,7 g/kg) das folhas frescas de *D. picta*, com os talos. Já durante a administração o animal apresentou salivagem e cada vez ficava mais difícil a administração da planta - o animal mastigava a planta, salivando muito, sem engolir-la. Interrompida a administração, o animal apresentou acentuada sialorréia. Às 19:10 h quando examinada a cavidade bucal, verificou-se ausência de edema. Às 22:35 h foi observado leve edema submandibular. No 2º, 3º e 4º dia do experimento, o animal apresentou sialorréia moderada, do 5º ao 8º dia sialorréia leve. No 2º dia apresentou acentuado edema submandibular, que no 3º dia era moderado e no 4º dia tinha desaparecido. Nunca foi observado edema sublingual nem desprendimento de epitélio lingual. No 2º dia o animal começou a comer, devagar mas continuamente. No 4º dia comia de maneira normal. Fezes, temperatura, movimentos ruminais, frequências cardíaca e respiratória sempre normais.

*Bovino 5228*, recebeu em 25.8.95, das 10:35 às 11:15 h, 950 g (4,8 g/kg) das folhas frescas de *D. picta*, com talos. Já durante a administração o animal apresentou salivagem e cada vez ficava mais difícil a administração da planta; o animal mastigava as folhas, salivando muito, sem engolir-las. Interrompida a administração, apresentou durante o resto do dia sialorréia moderada. Ia ao cocho para comer, mas só mexia no capim. Nos 7 dias seguintes sialorréia leve. No 2º dia do experimento edema submandibular moderado, que era leve no 3º e 4º dia, e no 5º dia tinha desaparecido. No 2º dia comeu moderadamente, depois normal. Fezes, temperatura, movimentos ruminais, frequências cardíaca e respiratória sempre normais.

#### *Rhododendron ledifolium*

*Bovino 4925*, recebeu em 22.1.93, das 9:00 às 10:28 h, 840 g (5,0 g/kg) das folhas frescas de *R. ledifolium*. Desde o início do 2º dia e no 3º dia do experimento de vez em quando sacudia a cabeça e regurgitava conteúdo ruminal que engolia ou vomitava. Com sinais de cólica (pisava no mesmo local, dava voltas na baía). Tinha sialorréia, instabilidade, midríase, apatia, anorexia. No final do 3º dia comia bem o capim, porém durante a noite do 3º para o 4º dia vomitou. Sempre apresentou hiperomotilidade ruminal. Fezes no 2º dia pastosas com muco. Sem sintomas a partir do final do 4º dia.

*Bovino 4996*, recebeu em 8.2.93, das 10:20 às 11:27 h, 1490 g (10,0 g/kg) das folhas frescas de *R. ledifolium*. No mesmo dia da administração da planta começou a ficar inquieto (cólica) e 1 hora e meia após vomitou conteúdo ruminal líquido. Dimetria. Andar desequilibrado. Midríase. Apatia. Sinais de cólica aumentando. Ocasional vômito e salivagem. Bradicardia. Ranger de dentes. No 2º dia apresentou poucos vômitos. Instabilidade aumentada. Anorexia. Nistagmo. No 3º dia bastante vômitos. Desequilibrado. Nistagmo. Comia capim. A ingestão de alimento e água estimulava o vômito. No 4º dia alguns vômitos. Comia capim. Apático. Andar desequilibrado com passos largos. Sintomas menos acentuados. No 5º dia ainda raros vômitos. À tarde recuperado.

*Bovino 5201*, recebeu em 20.1.93, das 10:47 às 11:02 h, 438 g (2,5 g/kg) das folhas frescas de *R. ledifolium*. Durante o 2º e parte do 3º dia, o animal apresentou de vez em quando episódios que tinham a seguinte seqüência: ficava inquieto, urinava e defecava, esticava o pescoço mantendo a cabeça na horizontal, salivava, ficava com o dorso arqueado, regurgitava conteúdo ruminal que vomitava, rangia os dentes, continuava a salivar. Tinha cólica (pisava no mesmo local). Ainda apresentou hiperomotilidade do rúmen, dilatação pupilar, bradicardia. Nunca deixou de comer capim. Sem sintomas a partir do final do 3º dia.

*Bovino 5202*, recebeu em 21.1.93, das 9:12 às 9:29 h, 550 g (2,5 g/kg) das folhas frescas de *R. ledifolium*. Durante o 2º dia do experimento com intensa diarreia de coloração verde acinzentada e com mau cheiro. Peristaltismo aumentado. Sinais de cólica (pisando no mesmo local). Focinho seco. No 3º dia fezes normais; a partir do meio dia raros episódios de regurgitação sem ou com vômito. Leve midríase. No 4º dia amanheceu recuperado.

*Bovino 5203*, recebeu em 13.2.93, das 14:20 às 16:16 h, 4060 g (20,0 g/kg) das folhas frescas de *R. ledifolium*. No mesmo dia da administração o animal tinha regurgitamentos sem vômito, salivagem, balançava a cabeça, mostrou inquietação, tinha nistagmo e polaciúria. Nas primeiras horas do 2º dia esteve com excitação, desorientado, em alerta, trocava as pernas, além de mostrar os sintomas acima mencionados. À tarde estava um pouco menos excitado; não comia, fezes diarreicas. No 3º e 4º dia havia regurgitamento sem e com vômito, sialorréia. Animal desequilibrado; fezes semi-líquidas. No 5º dia continuou com regurgitamento sem e com vômito; retração dos globos oculares, sialorréia, apatia, abdômen tenso, crises fortes de vômito. No 6º dia havia poucos vômitos; animal magro e fraco, fezes ressequidas, leve incoordenação, leve apatia. No 7º dia um pouco menos ativo, magro, com tenesmo. Não vomitou mais. Comia capim. À noite recuperado.

#### *Rhododendron indicum*

*Bovino 4919*, recebeu em 27.7.93, das 10:10 às 11:50 h, 1926 g (7,8 g/kg) das folhas frescas de *R. indicum*. No mesmo dia da administração animal inquieto, com tenesmo e fazendo movimentos de mastigação. Durante o 2º dia e no 3º na parte da manhã movimentos de regurgitação ocasionais, sem vômito, sialorréia, ranger de dentes, tenesmo, tremores musculares, dorso arqueado, pouco apetite, focinho seco, apatia, bradicardia. No 3º dia à tarde recuperado.

*Bovino 5205*, recebeu em 29.7.93, das 15:10 às 17:30 h, das 21:15 às 22:14 e 22:20 às 23:25 h, 4557 g (29,4 g/kg) das folhas frescas de *R. indicum*. A administração da planta foi interrompida duas vezes, pois o animal começou a regurgitar conteúdo ruminal. No 2º dia de manhã após o exame clínico caiu abruptamente em cima do cocho; foi erguido: desequilibrado, apático. Logo em seguida começaram vômitos, que durante a tarde se tornaram muito intensos. Exsiccose, retração dos globos oculares, sialorréia, anorexia, atonia ruminal, bradicardia, inquietação. À noite em decúbito esternal e durante algum tempo lateral; debilidade acentuada, superfície do corpo fria, tremores musculares. No 3º dia animal em decúbito esternal, com hipotermia, raros vômitos. Poucas fezes. Às vezes se levantava. Durante a noite na passagem para o 4º dia caiu em decúbito lateral; fazia movimentos desordenados com a cabeça. Hipotermia, bradipnéia com expiração longa e ruidosa; às vezes leves movimentos de pedalagem. Durante o 4º dia leves movimentos de regurgitação. Do 4º dia até o dia da morte no 19º dia, o animal ficou em decúbito lateral; de vez em quando era colocado em decúbito esternal, ficando por períodos variáveis nessa posição, geralmente com a cabeça encostada no flanco.

Hipotermia acentuada até o 6º dia, depois temperatura normal. Após mostrar bradicardia no começo do 4º dia, a frequência cardíaca variou entre normal a leve taquicardia. Nesse período às vezes tenesmo com poucas síbalas ressequidas, respiração mais abdominal. Exsicose, retração dos globos oculares. Atrofia muscular. *Achados de necropsia*: não foram constatadas alterações. Os *exames histopatológicos* (SAP 26749-52) não revelaram alterações dignas de nota. No miocárdio foram encontrados alguns pequenos focos em que as fibras cardíacas estavam com seu citoplasma bem eosinófilo e o seu núcleo picnótico; em algumas áreas havia leve edema entre as fibras cardíacas.

*Bovino 5206*, recebeu em 18.1.95, das 8:45 às 10:13 h, das 10:28 às 12:09, das 13:41 às 16:10 h e 17:10 às 17:33 h, 5945 g (29,0 g/kg) das folhas frescas de *R. indicum*. A administração da planta teve que ser suspensa finalmente, pois o animal se jogava no chão e não engolia a planta. Capim inteiro comia. No fim do primeiro dia regurgitou, com vômito, seguido de movimentos de mastigação com formação de espuma. Nas primeiras 6 horas do 2º dia (de 00:05 às 6:15 h) regurgitou 12 vezes, na maioria das vezes com vômito, as primeiras vezes em grande quantidade. Antes de cada regurgitamento o animal ficava inquieto, andando de um lado para o outro, sacudia a cabeça e depois dos regurgitamentos e vômitos ficava fazendo movimentos de mastigação, com formação de espuma aparecendo pela boca. Durante o dia se interessou pela comida no cocho (mexeu), mas não comeu. No fim do dia eliminou grande quantidade de fezes líquidas com mau cheiro. No 3º dia de manhã eliminou fezes líquido-pastosas. Durante o dia às vezes beliscava o capim. O rúmen funcionava normalmente. No 4º dia, na parte da manhã, comia devagar; na parte da tarde, vomitou grande quantidade, depois quantidades menores, seguidos de movimentos de mastigação com ranger de dentes e produção de espuma. Não defecou. No 5º dia eliminou fezes levemente ressequidas. Na parte da manhã comeu capim devagar, à tarde comeu bem. Não regurgitou nem vomitou. No 6º dia eliminou poucas fezes com pseudomembranas. Na parte da manhã comia devagar. À tarde vomitou grande quantidade de conteúdo ruminal por duas vezes, porém entre os vômitos comeu capim picado. Animal emagreceu muito. No 7º dia comia devagar durante o dia. Não regurgitou, nem vomitou. No 8º dia comia bem. Fezes levemente ressequidas e depois normais. Já à noite vomitou uma vez grande quantidade. No 9º dia comeu normalmente, fezes normais, não regurgitou nem vomitou mais. Considerado recuperado na parte da manhã.

*Bovino 5209*, recebeu em 18.1.95, das 8:49 às 9:57 h e das 10:45 às 11:30 h, 2780 g (20,0 g/kg) das folhas frescas de *R. indicum*. No fim do primeiro dia o animal começou a apresentar regurgitamento sem vômito, seguidos de movimentos de mastigação. Estes regurgitamentos sem vômito continuaram nas primeiras 6 horas do 2º dia, 7 vezes. Antes de cada episódio o animal ficava inquieto. Durante os movimentos de mastigação que se seguiam, frequentemente o animal rangia os dentes e havia formação de espuma. Não comia. Superfície do corpo fria. Durante o resto do dia foi visto regurgitando mais de 5 vezes, numa delas com um pouco de vômito. Às vezes ficava em pé, outras vezes em decúbito esternal. Eliminou pequena quantidade de fezes líquido-pastosas. Não comeu o dia todo. Arritmia cardíaca. No 3º dia continuou com os mesmos sintomas. Foi visto regurgitar 8 vezes, uma vez com vômito. Poucas fezes líquidas. Anorexia. Do 4º ao 6º dia continuou com os mesmos sintomas, mas cada vez com menos intensidade e menor frequência. Continuou fazendo movimentos de mastigação fazendo espuma. Superfície do corpo fria. Anorexia. Fezes ressequidas. No 7º dia regurgitou 4 vezes, duas vezes com vômito. Fezes normais. Na parte da manhã do 8º dia com os mesmos sintomas. À tarde começou a comer capim, cada vez mais. No fim do dia recuperado, mas muito magro.

*Bovino 5224*, recebeu em 18.1.95, das 10:47 às 11:24 h, 845 g (5,0 g/kg) das folhas frescas de *R. indicum*. O primeiro sintoma, no início do 2º dia, foi regurgitamento, sem vômito, 6 horas mais tarde já com vômito. Havia eliminação de líquido verde pelas narinas. Andar desequilibrado. Anorexia. Durante o 2º dia bastante regurgitamento com vômito. Entre os vômitos às vezes comia capim. No 3º dia só na parte da madrugada havia regurgitamento com vômito. Durante o dia inicialmente comia pouco capim, mas gradativamente mais. À noite recuperado.

*Bovino 5227*, recebeu em 18.1.95, das 8:45 às 10:05, 1670 g (10,0 g/kg) das folhas frescas de *R. indicum*. Os primeiros sintomas, no início do 2º dia, foram diarreia sob forma de fezes semi-líquidas e regurgitamento sem vômito. Nas próximas horas as fezes se tornaram líquidas. Anorexia. Na parte da tarde, o animal regurgitou e vomitou grande quantidade de conteúdo ruminal 4 vezes num prazo de 45 minutos. Antes sempre ficava inquieto. Passadas poucas horas, ruminou normalmente e comia capim. Na parte da manhã do 3º dia comeu bem, porém às 11:00 h ficou muito inquieto, teve salivação e houve regurgitamento com bastante vômito; depois continuou com movimentos de mastigação. À tarde comeu capim, mas à noite novamente regurgitou e vomitou muito duas vezes com intervalo de 3 horas. Fezes normais. No 4º dia ao meio dia e às 15 horas novamente regurgitou e vomitou abundantemente. Depois comeu devagar capim. No 5º dia fezes normais. Apetite e movimentos ruminais normais. No 6º dia fezes pastosas a líquidas. No 7º dia fezes e apetite normais.

## DISCUSSÃO

Verificamos que as folhas de várias plantas ornamentais submetidas à experimentação em bovinos, causaram intoxicação grave, às vezes com êxito letal.

A raridade da ocorrência de casos de intoxicação por essas plantas, sob condições naturais em bovinos, verificada através de revisão da literatura e experiência própria, deve estar ligada a dois fatores: à sua baixa palatabilidade e à falta de acesso dos bovinos a essas plantas de uma maneira geral, ainda mais que da maioria delas quantidades elevadas têm que ser ingeridas pelos bovinos para causar quadro de intoxicação. Exceção constitui *Nerium oleander*; doses pequenas de suas folhas já são letais. É praticamente a única planta ornamental por nós testada em bovinos sobre a qual há registros na literatura de casos de intoxicação natural.

Curiosamente em ovinos não há registros sobre a ocorrência de casos naturais de intoxicação por *N. oleander*. Nessa espécie animal a planta ornamental das que foram testadas por nós, mais importante, é *Rhododendron* sp. (Armién 1995), sobre a qual por sua vez não vimos registros de casos de intoxicação natural em bovinos.

Deve-se salientar que em nossos experimentos não foram incluídos as flores e os frutos das plantas por nós estudadas.

Discussões sobre a patogenia da intoxicação por *Nerium oleander* e da por *Rhododendron ledifolium* foram apresentadas no trabalho publicado sobre a intoxicação experimental com essas plantas em ovinos (Armién et al. 1994, 1995).

Interessante é fazer uma comparação dos quadros de intoxicação pelas folhas de *N. oleander* e *Rhododendron* spp. em bovinos e ovinos.

Em relação a *N. oleander*, os bovinos foram mais sensíveis que os ovinos, com a dose letal a metade da dos ovinos (0,25-0,5 g/kg e 0,5-1,0 g/kg, respectivamente). Nos ovinos os sintomas se relacionaram sobretudo aos sistemas respiratório, cardiovascular e digestivo, nos bovinos foram observados sintomas somente de natureza cardiovascular e digestiva. A dispnéia foi o sintoma que mais chamou atenção nos ovinos, ausente nos bovinos. Em relação aos sintomas cardiovasculares, nos ovinos ha-

via arritmia aliada a taquicardia, enquanto que nos bovinos havia arritmia com acentuada bradicardia. Os sintomas digestivos nos ovinos se restringiam a atonia ruminal, enquanto que nos bovinos havia acentuada diarreia, às vezes com presença de sangue. Na histopatologia foi constatada nos ovinos necrose coagulativa envolvendo grandes áreas da musculatura cardíaca inclusive de células de Purkinje; já nos bovinos a necrose coagulativa envolvia quantidade variável de fibras cardíacas e não foi vista necrose das células de Purkinje.

Em relação a *Rhododendron* spp., os ovinos por sua vez foram mais sensíveis que os bovinos (doses letais 15 e 30 g/kg, respectivamente). Em ambas as espécies o sintoma que mais chamou a atenção foram regurgitação sem ou com expulsão de conteúdo ruminal pela boca (vômito). Em ambas as espécies havia também ataxia. Nos ovinos havia ainda inquietação acentuada, dispnéia e arritmia cardíaca. Nos bovinos havia adicionalmente cólica e diarreia. Na histopatologia foram verificadas nos ovinos alterações do sistema nervoso central, sobretudo cromatólise de neurônios, o que não foi visto nos bovinos.

*Allamanda cathartica* causou sintomas e lesões que indicam que o seu efeito é devido à ação cáustica de seus princípios tóxicos.

Devido ao fato de provocar sintomas semelhantes a de *N. oleander*, *Thevetia peruviana* deve agir de maneira semelhante.

Não foi possível chegar a uma conclusão sobre a patologia da intoxicação por *Euphorbia pulcherrima*, que causou grande debilidade; nenhum dos nossos animais experimentais morreu, para a verificação de lesões que talvez contribuíssem a esclarecer este ponto.

*Datura arborea* provocou sintomas semelhantes aos verificados na intoxicação por outras espécies de *Datura*, ou seja os da intoxicação por atropina.

Um grupo à parte é constituído por algumas das plantas da família Araceae. Só em mastigar as folhas, os bovinos apresentavam intensa sialorréia. Só insistindo, é que se conseguia administrar quantidades moderadas, o que não aconteceria naturalmente. Mas mesmo com estas quantidades conseguiu-se só um quadro de intoxicação de intensidade moderada, caracterizado por sialorréia e edemas sublingual e submandibular e em um caso necrose do epitélio da língua. Não verificamos a presença dos cristais de oxalato de cálcio na mucosa do aparelho digestivo superior no bovino sacrificado, cristais esses em geral responsabilizados pelos sintomas de irritação observados após ingestão de plantas dessa família.

*Agradecimentos.*- Ao Prof. Pedro Germano Filho, do Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela identificação do material botânico, e à nossa equipe auxiliar, sobretudo ao Sr. João Luiz Bastos, pela eficiente ajuda na coleta das plantas e na execução dos experimentos.

## REFERÊNCIAS

Albuquerque J.M. 1980. Plantas Tóxicas no Jardim e no Campo. Min. Educ. Cultura, Fac. Ciênc. Agrárias do Pará, Belém.

- Aplin T.E.H. 1976. Poisonous Garden Plants and other Plants Harmful to Man in Australia. Bulletin 3964, Western Australian Department of Agriculture.
- Armién A.G. & Tokarnia C.H. 1994. Experimentos sobre a toxidez de algumas plantas ornamentais em ovinos. Pesq. Vet. Bras. 14(2/3):69-73.
- Armién A.G., Peixoto P.V., Barbosa J.D. & Tokarnia C.H. 1994. Intoxicação experimental por *Nerium oleander* (Apocinaceae) em ovinos. Pesq. Vet. Bras. 14(2/3):85-93.
- Armién A.G., Peixoto P.V., Barbosa J.D. & Tokarnia C.H. 1995. Intoxicação experimental por *Rhododendron ledifolium* (Ericaceae) em ovinos. Pesq. Vet. Bras. 15(1):1-9.
- Bazargani R.R. & Mirslami M. 1991. An investigation on the toxicity effects of oleander in large and small ruminants. Abstracts XXIV World Vet. Congr., Rio de Janeiro, Abstr. 2.4.2, p. 55.
- Ceccherelli R. 1929. Avvelenamenti da oleandro. Clínica Vet., Bari, Itália, no. 11:734. (Resumo em Berl. Tierärztl. Wschr. 48(5):72. 1932)
- Fowler M.E. 1980. Plant Poisoning in Small Companion Animals. Balston Purina Company, Saint Louis, Missouri. 51 p.
- Frohne D. & Pfänder H.J. 1984. A Colour Atlas of Poisonous Plants. Wolf Publishing Ltd, London.
- Gowanloch J.N. & Brown C.A. 1943. Poisonous Snakes, Plants and Black Widow Spider of Louisiana. Louisiana Dep. Conservation, New Orleans. (Cit. Kingsbury 1964)
- Henning M.W. 1932. Animal Diseases in South Africa. Vol. II. Virus and Deficiency Diseases, Plant Poisons. Central News Agency, South Africa.
- Hurst E. 1942. The Poison Plants of New South Wales. Snelling Printing Works, Sydney.
- Kehar N. & Rau G. 1945. *Nerium odorum* (oleander) poisoning in livestock. Indian J. Vet. Sci. 14:25-26.
- Kingsbury J.M. 1964. Poisonous Plants of the United States and Canada. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Lei Y. & Zhang K.X. 1983. Symptoms of poisoning caused by oleander in cattle, goats and experimental animals, and their electrocardiographic records. J. Fujian Agric. College 12(1):35-42. (Vet. Bull. Abstr. 7463. 1984)
- Mahin L., Marzou A. & Huat A. 1984. A case report of *Nerium oleander* poisoning in cattle. Vet. Human Toxicol. 26(4):303-304.
- Minardi I., Lunelli I.A., Capovilla L.C.T., Lopes J.B., Valle O.J.G. & Diniz J.M.F. 1982. Intoxicação accidental de bovinos por espirradeira (*Nerium oleander* L.). Revta Sector Ciênc. Agrárias, Curitiba, 4(1/2):89-92.
- Pinto F., Palermo D., Milillo M.A. & Iaffaldano D. 1981. Um episodio di avvelenamento da oleandro (*Nerium oleander*). Clinica Vet., Bari, Italia, (1):15-18.
- Quortrup E.R. & McFarland R.J. 1956. Animal losses involving noxious weeds in San Diego County. Calif. Vet. 9(5):14-17.
- Roth L., Daunderer M. & Kormann K. 1984. Giftpflanzen - Pflanzengifte, Vorkommen, Wirkung, Therapie. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg, 1032 S., 401 farbige Abb.
- Scavone O. & Panizza S. 1980. Plantas Tóxicas. CODAC-USP, São Paulo. 110 p.
- Sobhan M.A. 1980. Rakta Karabi (*Nerium indicum*) poisoning in cattle. Bangladesh Vet. J. 14(4):29-31.
- Steyn D.G. 1941. The poisoning of human beings by wild plants, ornamental plants and domestic poisons. Farming in South Africa, Reprint no. 6. 8 p.
- Thakur D.K. & Verma B.B. 1982. *Nerium odorum* poisoning in bovine. (Letters to the Editor). Indian J. Vet. Med. 2(2):85-86.
- Thimmiah K. 1972. Nerium poisoning in cattle. Indian Vet. J. 49:942-946.

- Tokarnia C.H., Canella C.F.C. & Döbereiner J. 1967. Experimentos com plantas suspeitas de serem tóxicas realizados em bovinos no Estado do Rio de Janeiro, que resultaram negativos ou em perturbações leves passageiras. *Pesq. Agropec. Bras.* 2:343-351.
- Vermunt J. 1987. Oleander - decorative and very poisonous. *N. Z. Vet. J.* 35(8):138-139.
- Wagstaff D.J. 1992. Plant Poisoning in Humans, p. 340-348. In: James L.F., Keeler R.F., Bailey E.M., Cheeke P.R. & Hegarty M.P. (ed.) *Poisonous Plants. Proc. 3rd Int. Symposium.* Iowa State University Press, Ames.
- Wilson F.W. 1909. Oleander poisoning of livestock. *Bull. 59, Arizona Agric. Expt Stn.* (Cit. Hurst 1942)

## RADIOLOGICAL STUDY OF HEREDITARY LYMPHEDEMA IN HEREFORD CATTLE<sup>1</sup>

Ana Lucia Schild<sup>2,3</sup>, Luis Paiva Carapeto<sup>4</sup>, Franklin Riet-Correa<sup>2,3</sup>, Maria del Carmen Méndez<sup>2,3</sup> e Gessi Guerreiro<sup>4</sup>

SINOPSE.- Schild A.L., Carapeto L.P., Riet-Correa F., Méndez M.C. & Guerreiro G. 1996. **[Estudo radiológico de hipoplasia linfática hereditária em bovinos Hereford.]** Radiological study of hereditary lymphedema in Hereford cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(1):21-26. Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, UFPel, Campus Universitário, Pelotas, RS 96010-900, Brazil.

Hipoplasia linfática hereditária foi estudada através do exame radiológico do sistema linfático periférico de sete bovinos da raça Hereford com diagnóstico clínico da doença. Quatro bovinos saudáveis, da mesma raça, pertencentes a um rebanho livre da doença foram utilizados como controle. Dezesesseis bovinos sem sinais clínicos, pertencentes a um rebanho experimental, no qual a doença foi reproduzida, foram, também, estudados com o objetivo de detectar-se casos subclínicos da enfermidade. Após a sedação dos animais e anestesia local, foi feita uma incisão na pele, no terço médio da face lateral dos ossos metacarpo e metatarso para exposição dos vasos linfáticos, marcados previamente por azul de metileno. Nos vasos linfáticos foi injetado meio de contraste e foram tomadas radiografias nas regiões anatômicas onde estão localizados os linfonodos pré-escapulares e poplíteos. Nas radiografias eram medidos o calibre dos vasos linfáticos e as dimensões dorso-ventral e crâneo-caudal dos linfonodos. Este estudo demonstrou ser a linfografia direta eficiente para a avaliação do sistema linfático periférico dos membros posteriores de bovinos com hipoplasia linfática. As lesões observadas, de hipoplasia e/ou aplasia do sistema linfático periférico, caracterizaram-se por redução no número e aumento do diâmetro ou ausência de vasos linfáticos e diminuição do tamanho ou ausência dos linfonodos poplíteos. Nos animais que não apresentavam sinais clínicos não foram observadas alterações no sistema linfático periférico que permitissem a detecção de casos subclínicos da enfermidade.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Hipoplasia linfática, doenças hereditárias, linfoedema hereditário.

ABSTRACT.- A radiological study of the fore and hind limb lymphatic system was performed in seven calves with hereditary hypoplasia. Four healthy calves from an unrelated Hereford herd were used as a control group. Sixteen calves, without signs of disease, from an experimental affected herd were also studied to detect subclinical cases of lymphedema. After sedation and local anaesthesia a trian-

gular flap of skin was reflected over the lateral aspect of the metacarpus and metatarsus to expose the subcutaneous lymphatics, which were previously stained by methylene blue injected subcutaneously into the interdigital space. The contrast medium was injected into the stained lymph vessels and lymphographies were taken in the anatomical regions where the popliteal and prescapular lymph nodes are located. The lymphangiograms obtained were used to determine the caliber of lymph vessels and the cranio-caudal and proximo-distal dimensions of the popliteal lymph nodes. It was demonstrated that direct lymphography is a suitable method to study the peripheral lymphatic system in the hind limbs of cattle with hereditary lymphatic hypoplasia. The lesions were hypoplasia and/or aplasia of the peripheral lymphatic system, characterized by decreased number and enlargement or absence of peripheral lymph

<sup>1</sup>Accepted for publication on January 5, 1996.

<sup>2</sup>Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>3</sup>Bolsista Pesquisador do CNPq.

<sup>4</sup>Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

vessels and decreased size or absence of popliteal lymph nodes. In calves without clinical signs the peripheral lymphatic lesions which would allow to detect subclinical cases were not observed.

**INDEX TERMS:** Lymphatic hypoplasia, hereditary diseases, hereditary lymphedema.

## INTRODUCTION

Congenital hereditary lymphedema is a disease characterized by defective development of the peripheral lymphatic system that results in edema of different degrees mainly involving limbs and tail (Leighton & Suter 1979). The disease affects many species including cattle (Donald et al. 1952, Morris et al. 1954), dogs (Patterson et al. 1952) and man (Kinmonth 1965). In Ayrshire cattle the defect is due to an autosomal recessive trait which results in smaller than normal superficial lymph nodes and dilated and tortuous afferent lymph vessels (Morris et al. 1954). In Hereford cattle the disease is characterized by edema of the hind limbs and, sometimes, fore limbs, tail and prepuce and lesions are hypoplasia and aplasia of peripheral lymph vessels and prescapular, iliofemoral and popliteal lymph nodes (Schild et al. 1991). It is transmitted by an autosomal dominant gene with variable expressivity and incomplete penetrance (Schild et al. 1991).

This report describes a radiological study of the lymphatic system of Hereford cattle with hereditary lymphedema. With the aim to detect subclinical cases, calves without clinical signs from the affected herd were also studied.

## MATERIALS AND METHODS

Three groups of calves were used for radiological studies: Group 1 (control) had four healthy Hereford calves; Group 2 (affected) had seven calves with variable degrees of edema in the hind and fore limbs; and Group 3 (suspected) had 16 calves without signs of the disease. Calves of Group 1 were from an unrelated Hereford herd. Calves of Group 2 were from the herd in which the disease was diagnosed and calves from Group 3 were born from the experimental test mating performed to determine the hereditary origin of the condition (Schild et al. 1991). Calves from Group 2 had slight edema at the fetlock and distal metatarsal region of the hind limbs (pattern a); two calves had edema of the hind limbs below the femoro-tibial joint and in the fore limbs below the carpus (pattern b). One calf had slight edema at the fetlock only in the hind limbs. Age and body weight of the calves are presented in Table 1.

In Group 1 and 2, lymphangiograms were performed in the anatomical regions where the popliteal and prescapular lymph nodes are located. The prescapular lymph node is situated at the cranial border of the supraspinatus muscle, 10-12 cm above the level of the shoulder joint and it is covered by the omotransversarius and brachiocephalicus muscles; the popliteal node is situated in a mass of fat on the gastrocnemius muscle, caudal the tibial and peroneal nerves and between the biceps femoris and semitendinosus muscles (Sisson & Grassman 1981). In Group 3 the lymphangiographies were carried out only in the hind limbs.

After sedation with 0.2 mg/kg body weight of xylazine chloride 2-3 ml of methylene blue dye in 5% aqueous solution were injected subcutaneously in the interdigital space of the four limbs

of calves from Group 1 and 2, and only in the hind limbs of calves from Group 3. Five to 10 minutes later, after local infiltration with xylocaine 2%, a triangular flap of skin was reflected over the lateral aspect of the metatarsus and metacarpus to expose the subcutaneous lymphatics. This flap was formed by two 5 cm incisions, one vertical and the other horizontal, whose ends met at 90° on the caudal aspect of the lateral surface. At this time lymph vessels were evaluated for number and shape. The contrast medium (Hypaque®) at the dose of 8.0 ml mixed with 2 ml xylocaine 2% was injected via an intravenous infusion set (Veniscalp® 23 G) into a lymphatic vessel stained by methylene blue.

Lymphangiograms were taken in the medial-lateral position of the hind limbs and the external-lateral position of the forelimbs at three different times: before the injection of methylene blue (time 0); immediately after the contrast medium injection (time 1); and after 15 minutes (time 2). They were taken with a FNX machine, 80Kv and 15 mAs, with an exposure time of 1.5 seconds. The films were Sakura or Kodak, 24x30cm. The area covered by the radiographies is observed in Fig. 1.

Lymphangiograms obtained in time 1 were used to determine the caliber of lymph vessels and the cranio-caudal and proximo-distal dimensions of the popliteal lymph nodes. For measuring lymph vessels on the lymphographies, a line that passed on tangentially to the distal femur epiphysis, perpendicular of the lymph vessels was considered. The caliber of the vessels was measured in two points located 1 and 2 cm above the intersection of the line with the vessel, and in three points located 1, 2 and 3 cm below the same intersection.

## RESULTS

### *Methylene blue staining*

The number of lymph vessels stained by methylene blue in each limb of calves from the three groups is presented in Table 1. In the fore limbs of calves from Group 1 the two superficial lymph vessels stained by methylene blue were observed beside the dorsal common digital vein or they were on the deep surface of the dermis when the skin was reflected (Fig. 1). In the hind limbs the two vessels were observed beside the saphenous lateral vein. In calves from Group 2 and 3 the lymph vessels were located in the same place. All lymph vessels observed in the limbs of calves from Group 1 and 3 had an uniform caliber. In calves from Group 2 the lymph vessels were enlarged and had a sacculated shape. In calves that did not have superficial lymph vessels the methylene blue was spread in the subcutaneous edema.

### *Times 0 lymphographies*

In time 0 lymphographies lesions were not observed in calves from the three groups.

### *Time 1 lymphographies*

In the fore limbs of calves from Group 1 and 2 satisfactory lymphangiograms were not consistently obtained and the lymph vessels were not measured. In two calves from Group 1 the lymph node opacification did not occur because the contrasted lymph vessel drained directly to the thoracic wall. It also was not possible to measure the prescapular lymph nodes because they were partially obscured by bone structures.

Table 1. Age and body weight of calves from the three groups and number of lymph vessels stained by methylene blue

Calf	Age (months)	Body weight (kg)	Number of lymph vessels stained by methylene blue			
			Fore limbs		Hind limbs	
			Right	Left	Right	Left
Group 1 (control)						
1	6	150	2	2	2	2
2	6	140	2	2	2	2
3	6	95	2	2	2	2
4	6	85	2	nd <sup>a</sup>	2	nd
Group 2 (affected)						
5	1	42	0	0	0	0
6	18	150	1	1	1	1
7	18	154	1	1	1	1
8	18	125	0	1	0	0
9	10	123	nd	nd	0	0
10	10	125	nd	nd	0	0
11	10	60	1	1	0	0
Group 3 (unknown)						
12	12	56	nd	nd	2	2
13	4	92	nd	nd	1	1
14	3	76	nd	nd	2	2
15	4	55	nd	nd	2	2
16	4	94	nd	nd	2	1
17	3	57	nd	nd	2	2
18	3	61	nd	nd	2	3
19	3	63	nd	nd	2	2
20	4	70	nd	nd	2	2
21	6	78	nd	nd	2	2
22	6	102	nd	nd	2	2
23	3	65	nd	nd	1	1
24	3	58	nd	nd	1	1
25	3	53	nd	nd	1	2
26	3	68	nd	nd	1	1
27	4	85	nd	nd	2	1

<sup>a</sup> Not done.

Lymphangiograms of hind limbs allowed the evaluation of the lymph vessels and popliteal lymph nodes in all calves into which the contrast medium was injected. In calves from Group 1 (control) one or two main lymphatic channels extend from the metatarsal region proximally to the popliteal lymph node (Fig. 2). In Group 2 and 3 the lymph vessels were in the same place. Into five calves from Group 2 the contrast medium was not injected due to aplasia of lymph vessels (Table 2). Lymphographies were performed in two calves. The lymph vessels from these calves were enlarged and had a sacculated shape; one calf had aplasia of the right popliteal node (Fig. 3).

Hypoplasia of lymph vessels and nodes were observed in calves with slight edema of the hind limbs (pattern a) and in calves with edema of the four limbs (pattern b). Aplasia of lymph vessels and popliteal nodes were only observed in calves with edema of all limbs (pattern b). Abnormalities were not detected in lymphographies of calves from Group 3.

The mean and standard deviation of lymph vessel calibers of the calves from the three groups are in Table 2.

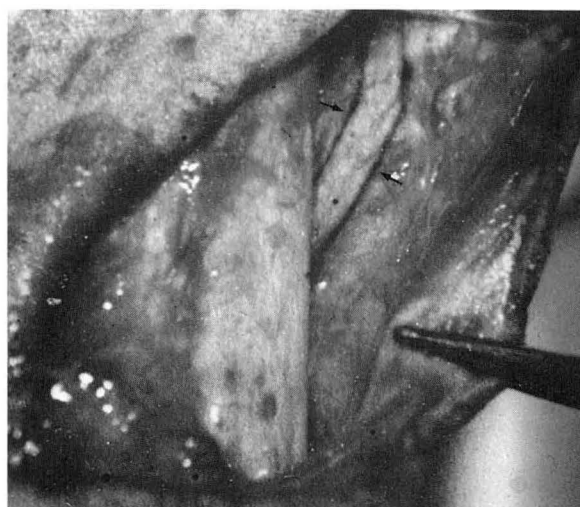


Fig. 1. Calf from Group 1 (Control). Two lymph vessels are observed in the deep surface of the dermis (small arrows) when the skin was reflected, 5 minutes after methylene blue injection into the interdigital space.



Fig. 2. Calf from Group 1 (Control). Time 1 lymphography. Three lymph vessels and the popliteal lymph node are observed.



Fig. 3. Calf from Group 2 (Affected). Time 1 lymphography. An enlarged lymph vessel with a sacculated shape is observed. The popliteal lymph node is absent.

Table 2. Mean and standard deviation of the afferent lymph vessel calibers (cm) of calves from the three groups

Group	n <sup>a</sup>	X	±	S	Range
1	50	0.0972A <sup>b</sup>	±	0.0055	0.09-0.11
2	20	0.4175B	±	0.0396	0.35-0.50
3	205	0.1069A	±	0.0252	0.08-0.20

<sup>a</sup> n = number of measurements.

<sup>b</sup> Means followed by different letters have significant difference by Tukey test (P<0.01).

The lymph vessel calibers of calves from Group 2 were significantly larger than the lymph vessel calibers of calves from Group 1 and 3. No differences were observed in the lymph vessel calibers between calves from Group 1 and 3 (Table 2). The size of the popliteal lymph nodes of calves from the three groups are presented in Table 3.

#### Time 2 lymphographies

In time 2 lymphograms no lymphatic structures were observed in calves from Group 1. In calves from Group 2 opacification of popliteal lymph nodes was observed also at this time. In calves from Group 3 time 2 lymphangiograms were not performed.

Table 3. Dimensions of the popliteal lymph nodes observed radiologically in calves from the three groups

Group	Mean of cranio-caudal and dorso-ventral dimensions of popliteal lymph nodes from all calves of each group				
	N <sup>o</sup> of measurement	X	±	S	
1	14	3.054	±	0.568	A <sup>a</sup>
2	6	2.243	±	0.415	B
3	62	2.575	±	0.572	A

<sup>a</sup> Means followed by different letters have significant differences by last significance difference of Fisher (LSDF) (P<0.01).

#### DISCUSSION

It was shown that direct lymphography is a suitable method to study the peripheral lymphatic system in the hind limbs of cattle with hereditary lymphatic hypoplasia. The radiological changes observed in the affected animals are similar to those previously reported in other species (Kinmonth et al. 1955, Skelley et al. 1964, Patterson et al. 1969, Leighton & Suter 1979, Davies et al. 1979).

In the affected cattle the technique allowed a previous evaluation of the peripheral lymphatic system, before the contrast medium infusion. The absence of lymph vessels and the observation of methylene blue dye spread into the



Fig. 4. Calf from Group 2 (Affected). Time 1 lymphography. An enlarged lymph vessel with a sacculated shape is observed. Note the decreased size of the popliteal lymph node.

subcutis demonstrated the aplasia of the peripheral lymph vessels in some calves, and the presence of only one lymph vessel (hypoplasia) in others. Similar findings are reported in man (Kinmonth 1965).

The lymphangiograms performed in calves from Group 2 showed that the main peripheral lesions of the lymphatic system were hypoplasia or aplasia of the popliteal node and enlargement of lymph vessels. These changes appear to be similar to those reported in dogs and man (Kinmonth 1965, Patterson et al. 1967, Davies et al. 1979, Leighton & Suter 1979). Nevertheless in dogs the lymph vessels ended blindly in the region normally occupied by the popliteal lymph node, which was absent (Patterson et al. 1967, Davies et al. 1979). In lymphedema of Ayrshire cattle, enlarged afferent and efferent lymph vessels were observed at necropsies, but aplasia of lymph nodes is not reported (Morris et al. 1954).

In man and dogs with lymphedema increase in size and number of lymphatic vessels are reported as an hyperplasia (Kinmonth 1965, Olszewski et al. 1972, Davies et al. 1979). In Hereford cattle the enlargement of lymph vessels was not considered an hiperplasia, but a consequence of the arrested lymph flow.

The sacculated shape observed in lymph vessels of calves from Group 2 was probably due to the proliferation of endothelium of valves normally present in lymph vessels. In affected Hereford calves endothelial proliferation forming

valve-like structures in lymphatic vessels was also observed histologically (Schild et al. 1991). Morris et al. (1954) studying two affected Ayrshire calves mentioned extensive proliferation of the endothelium leading to the formation of strands of tissue that in many cases divided the lumen of vessels.

In a previous report it was shown that the disease is transmitted by an autosomal dominant gene with variable expressivity and incomplete penetrance (Schild et al. 1993). Different degrees of edema observed in Hereford cattle showed the variable expressivity of the gene and could indicate the occurrence of calves without clinical signs of the disease but with minimal lesions of the peripheral lymphatic system. Nevertheless, in calves from Group 3, without clinical signs of the disease, lesions of the peripheral lymphatic system were not evidenced by lymphangiographies. In man cases of lymphatic hypoplasia escape clinical detection, resulting in generations that do not have clinical signs (Esterly 1955).

Luginbühl et al. (1967) observed absence of prescapular nodes in dogs without edema of the fore limbs and absence of popliteal nodes in dogs with transient edema of the hind limbs. They suggested that the lack of regional lymph nodes was one of the manifestations of a more generalized defect in the development of the peripheral lymphatic system, and that in a few cases morphogenesis apparently may continue after birth, with formation of abnormal lymphatic vessels and nodes, but with functionally adequate lymphatic drainage. This apparently does not occur in Hereford cattle because the aplasia of lymph vessels and popliteal nodes was observed only in calves with severe degree of edema (pattern b).

In the affected calves popliteal lymph nodes still were opacified in time 2 lymphangiographies suggesting that edema is a consequence of a deficient lymph flow due to the hypoplasia of lymph vessels and nodes. In man and dogs the aplasia and hypoplasia is also considered to be responsible for the insufficiency of lymph fluid removal and edema formation (Esterly 1965, Leighton & Suter 1979). On the other hand, Patterson et al. (1967) mentioned the obstruction of lymph vessels as the main cause of edema. In Hereford cattle the obstruction of lymph channels was not observed in the lymphangiographies.

*Acknowledgments.*- We are grateful to Dr. Donald McGavin for assistance with the manuscript. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERENCES

- Davies A.P., Hardy R., Larsen R., Lees G.E. & Hayden D.W. 1979. Primary lymphedema in three dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174(12): 1316-1320.
- Donald H.P., Deas D.W. & Wilson A.L. 1952. Genetical analysis of the incidence of dropsical calves in herds of Ayrshire cattle. *Brit. Vet. J.* 108:227-245.
- Esterly J.R. 1965. Congenital hereditary lymphoedema. *J. Med. Genet.* 2:93-98.
- Kinmonth J.B. 1965. Primary lymphoedema of the lower limb. *Proc. Royal Society of Medicine* 58:1021-1023.
- Leighton L. & Suter P.F. 1979. Primary lymphedema of the hindlimb in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175(4):369-374.

- Luginbühl H., Chackro S.K., Patterson D.F. & Medway W. 1967. Congenital hereditary lymphoedema in the dog. Part II. Pathological studies. *J. Med. Genet.* 4:153-165.
- Morris B., Blood D.C., Sidman W.R., Steel J.D. & Whithen J.H. 1954. Congenital lymphatic oedema in Ayrshire calves. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 32:265-274.
- Olszewski W., Machowski Z., Sokolowski J., Sawicki Z., Zerbino D. & Nielubowicz J. 1972. Primary lymphedema of lower extremities. 1. Lymphangiographic and histological studies of lymphatic vessels and lymph nodes in primary lymphedema. *Polish Med. J.* 11(6):1564-1572.
- Patterson D.F., Medway W. Luginbühl H. & Chackco S. 1967. Congenital hereditary lymphoedema in the dog. *J. Med. Genet.* 4:145-152.
- Schild A.L., Riet-Correa F., Méndez M.C. 1991. Hereditary lymphedema in Hereford cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3:47-51.
- Sisson S. & Grossman G. 1981. *The Anatomy of the Domestic Animals.* 4th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, p. 626-779.

## DIAGNÓSTICO DA DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO EM BOVINOS PELOS EXAMES HISTOLÓGICOS E MICRORRADIOGRÁFICOS DE COSTELAS<sup>1</sup>

Célso Pilati<sup>2</sup>, Iveraldo S. Dutra<sup>3</sup>, Konrad Behrens<sup>4</sup>, Jürgen Döbereiner<sup>5</sup>  
e Klaus Dämmrich<sup>6</sup>

**ABSTRACT.-** Pilati C., Dutra I.S., Behrens K., Döbereiner J. & Dämmrich K. 1996. [**Diagnosis of phosphorus deficiency in cattle by histologic and microradiographic examination of ribs.**] Diagnóstico da deficiência de fósforo em bovinos por exames histológicos e microrradiográficos de costelas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(1):27-33. Laboratório de Patologia Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, UDESC, Cx. Postal 281, Lages, SC 88520-000, Brazil.

The objective of the present study was to show the efficiency of histologic and microradiographic techniques performed on rib bone samples as a mean of diagnosing the phosphorus status of cattle raised on phosphorus deficient pastures and receiving different mineral supplements. The rib samples were obtained from cattle of different ages which died from disease that was clinically and epidemiologically diagnosed as botulism. Ten out of 24 juvenile and adult animals studied exhibited alterations of osteomalacia, while the others without those alterations served as controls. It is suggested that the method could be useful to improve the diagnosis of phosphorus deficiency of cattle in Brazil.

**INDEX TERMS:** Phosphorus deficiency, cattle, diagnosis, histologic and microradiographic examination, rib bone.

**SINOPSE.-** O objetivo do presente estudo foi de mostrar a eficácia de exames histológicos e microrradiográficos de costelas para avaliar o "status" de fósforo em bovinos criados em pastagens deficientes neste elemento e que rece-

beram suplementos minerais diversos. As amostras de costelas foram coletadas de animais de diferentes idades, os quais morreram de doença com diagnóstico clínico e epidemiológico de botulismo. Dez dos 24 bovinos estudados mostraram alterações de osteomalácia, ao passo que os outros sem estas alterações serviram de controles. Sugere-se que o método poderia ser útil para aperfeiçoar o diagnóstico da deficiência de fósforo em bovinos no Brasil.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Deficiência de fósforo, bovinos, diagnóstico, exames histológicos e microrradiográficos, costela.

### INTRODUÇÃO

O custo de suplementar fósforo aos bovinos em pastagens deficientes é relativamente elevado, sendo o elemento responsável por mais de 50% do ônus representado pelo uso de misturas minerais. Por esta razão, pesquisadores de países como os Estados Unidos, África do Sul e Austrália vêm buscando uma técnica eficiente de diagnóstico do "status" de fósforo dos bovinos, que permita prever a quantidade do elemento a ser suplementada e os resulta-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 10 de janeiro de 1996.

Parte do trabalho de tese de Doutorado do primeiro autor defendida na Universidade Livre de Berlin, em 11 de julho de 1994, como bolsista do CNPq/DAAD (Convênio bilateral Brasil/Alemanha).

<sup>2</sup> Laboratório de Patologia Animal, CAV, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Av. Luiz de Camões 2090, Cx. Postal 281, Lages, SC 88520-000.

<sup>3</sup> Depto Produção e Saúde Animal, Unesp-Campus de Araçatuba, Rua Clóvis Pestana 793, Caixa Postal 533, Araçatuba, SP 16050-680; bolsista do CNPq (305967/85-1).

<sup>4</sup> Depto Epidemiologia e Saúde Pública, Setor de Anatomia Patológica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), como bolsista consultor de ensino e pesquisa do CNPq/DAAD (Convênio bilateral Brasil/Alemanha).

<sup>5</sup> Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970; bolsista do CNPq (305294/88-1).

<sup>6</sup> Institut für Veterinär-Pathologie, Freie Universität Berlin, Strasse 518, Nr. 15, D-14163 Berlin, Alemanha.

dos a esperar. Neste contexto, técnicas tradicionais - tais como dosagem do P inorgânico no sangue, determinação da concentração de P em amostras de ossos (esterno, costelas, vértebras) obtidos por biópsia, medidas da espessura da camada cortical dos ossos - têm-se mostrado ineficientes para prever a condição de nutrição fosfórica do animal e para diferenciar entre bovinos suplementados ou não sob condições de moderada deficiência do elemento. Tais técnicas têm-se mostrado efetivas apenas nos casos de extrema e prolongada deficiência do mineral na dieta e/ou nas condições em que as demandas do elemento se acham exacerbadas, como no caso de vacas nos primeiros meses de lactação.

Com o objetivo de encontrar uma alternativa para a melhor avaliação da eficácia da suplementação de fósforo em rebanhos bovinos, criados em pastos deficientes neste elemento (Tokarnia et al. 1988), foram empregadas técnicas histológicas e microrradiográficas em uso no Instituto de Patologia Veterinária da Universidade Livre de Berlin, para o exame de costelas coletadas de bovinos, mantidos em regime de criação extensiva de campo, com e sem deficiência de fósforo, na Região Centro-Oeste do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Bovinos*

Os animais estudados foram necropsiados em regiões com deficiência de fósforo e suplementação mineral variável, no decorrer de diagnósticos clínicos e epidemiológicos de botulismo, nos Estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e São Paulo (Döbereiner et al. 1990, Dutra et al. 1993). Foram examinados 24 bovinos, fêmeas, mestiços Zebu, com 2 a 8 anos de idade, dos quais foram coletadas amostras de costelas para os estudos histológicos e microrradiográficos, realizados no Instituto da Patologia Veterinária da Universidade Livre de Berlin, Alemanha.

### *Costelas*

As amostras foram obtidas do corpo costal e da junção condrocostal das 6<sup>a</sup> ou 13<sup>a</sup> costelas através de corte transversal e fixados em formol neutro a 10%.

### *Preparação do material*

Os exames foram realizados em cortes não descalcificados, do material incluído em metilmetacrilato. A inclusão procedeu-se da seguinte maneira: as amostras fixadas foram lavadas em água corrente e desidratadas em etanol (etanol 70% durante 3 dias, etanol 96% durante 2 dias e etanol absoluto durante 4 dias, trocando-se o etanol após 2 dias), seguido por desidrogenamento em etanol-clorofórmio 1:3 durante 4 dias, com uma troca no segundo dia. As amostras foram então colocadas em acetona por 2 dias. Para a inclusão em metilmetacrilato foi feita a seguinte mistura:

Metilmetacrilato (Merck 800590)	2000 ml
Poliétilenoglicol 1500 (Merck 807489)	400 ml
Peroxido de benzoila (Merck 8016419)	40 g

Após 1 dia de imersão na solução de metilmetacrilato, esta foi trocada. A polimerização foi obtida lentamente em um banho-maria para melhorar a penetração da solução nas amostras. A

água do banho-maria tinha uma temperatura de 26°C aumentando-a até 32°C. A polimerização completa ocorria no máximo em 10 dias.

### *Exames histológico-morfométricos*

Dos fragmentos de costelas em metilmetacrilato foram tirados cortes longitudinais de 7µm de espessura com um micrótomo de cortar tecidos duros (K-mot. Fa. Jung, Heidelberg). Os cortes foram realizados com auxílio de uma fita Durex cristal-clara. Após secar entre duas lâminas de vidro a 38°C, os cortes foram corados sem retirar a fita Durex e o metilmetacrilato pelo método do tricromico de Goldner (Romeis 1989).

Para a interpretação morfométrica usou-se um aparelho de análise de campo ASM 68K da Firma Leitz/Wetzlar. Calculou-se a espessura das bainhas osteóides na superfície das trabéculas e da superfície interna da compacta, pela medida da área da bainha osteóide (µm<sup>2</sup>) dividida pelo seu maior comprimento (µm). Nos canais de Havers a espessura das bainhas osteóides foi calculada através da média de quatro medidas em pontos diferentes. A correlação da superfície quiescente, da superfície de aposição e da superfície de reabsorção foi estimada semiquantitativamente com auxílio de uma retícula ocular.

### *Estudo microrradiográfico*

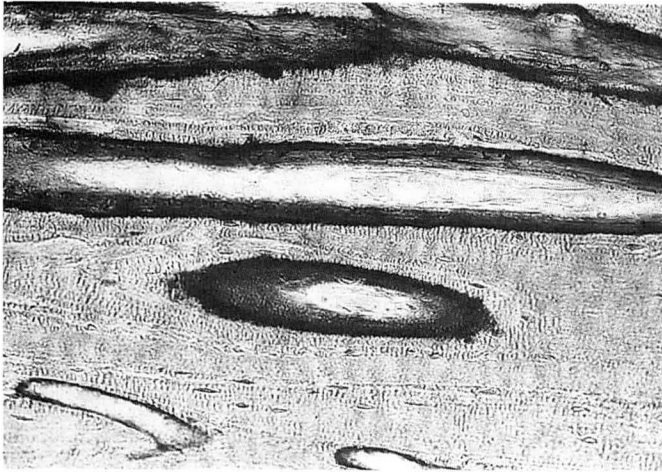
Dos blocos de metilmetacrilato foram tirados cortes de cerca 80µm de espessura por meio de serra mineralógica (Fa. Steeg & Reuter), utilizando-se uma lâmina HSS. Os cortes foram feitos sob água corrente e colocados entre duas placas de vidro e postos em estufa a 38°C para secar. Em seguida, os cortes foram colocados sobre uma "Kodak High Resolution Plate" para realização da microrradiografia de contato. Como fonte de irradiação foi usado um aparelho de raio-X (MUR Fa. Phillips) operando a 20 kv.

As microrradiografias foram examinadas com auxílio de um microscópio com aumentos de até 100 vezes. Foi interpretado o grau de mineralização das lamelas dos osteôneos, das lamelas do endóstio e o das trabéculas, onde um alto grau de mineralização correspondia ao das lamelas intersticiais; em comparação com esses osteôneos foram identificados osteôneos com médio e baixo grau de mineralização.

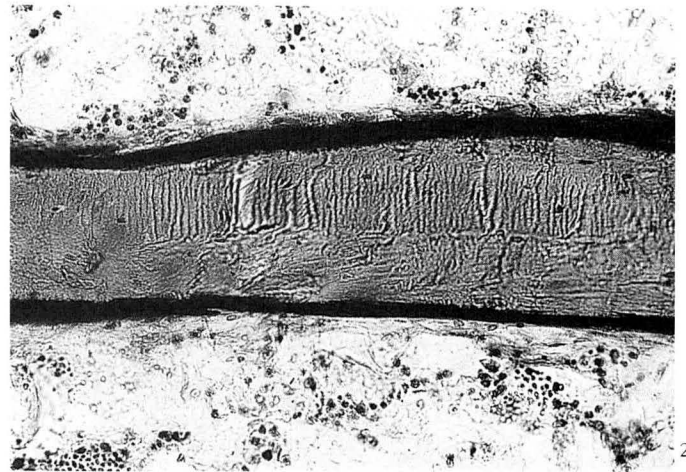
## RESULTADOS

Das 24 amostras de costelas de bovinos jovens e adultos, examinadas através dos estudos histológicos e microrradiográficos, dez apresentaram alterações de osteomalácia onde nos cortes histológicos observou-se um aumento na espessura da bainha de osteóide, atingindo espessura máxima de até 19,4µm no revestimento dos canais de Havers, espessura de 25,9µm na superfície do endóstio e de 27,5µm na superfície das trabéculas (Quadros 1 a 3). Nos casos de osteomalácia, a superfície óssea revestida por osteóide era muito maior nos animais com deficiência crônica de fósforo do que nos animais sem essa deficiência. Por vezes toda superfície da trabécula ou do endóstio estava revestida pela substância osteóide. O número de osteôneos revestidos por osteóide era muito superior nos animais com osteomalácia do que nos sem osteomalácia (Fig. 1 a 4).

Ao exame microrradiográfico verificou-se que nos animais com hipofosfatemia crônica predominavam os osteô-



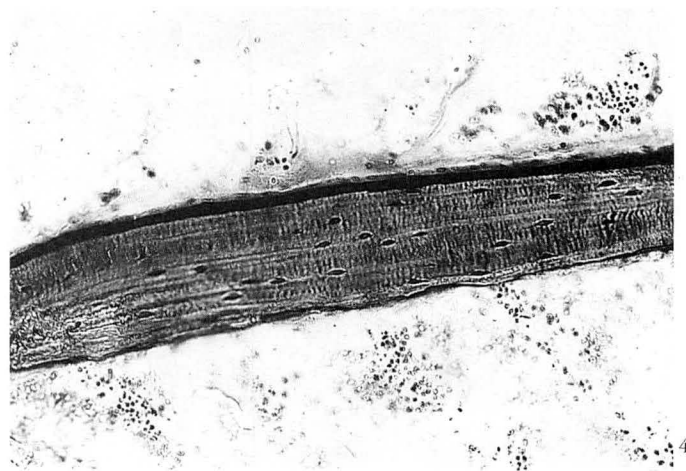
1



2



3



4

Fig. 1. Revestimento dos canais de Havers por tecido osteóide. Corte longitudinal da compacta de costela de bovino com osteomalácia. Tricrômico de Goldner, obj. 25.

Fig. 3. Osteôneos com canais de Havers uniformemente estreitos e com bainhas osteóides delgadas. Corte longitudinal da compacta de costela de bovino sem osteomalácia. Tricrômico de Goldner, obj. 10.

Fig. 2. Trabécula esponjosa coberta, de todos os lados, da bainha osteóide, em costela de bovino com osteomalácia. Tricrômico de Goldner, obj. 25.

Fig. 4. Bordo de reabsorção sem osteóide e bordo oposto de aposição com bainha de osteóide, numa trabécula esponjosa de costela de bovino sem osteomalácia. Tricrômico de Goldner, obj. 25.

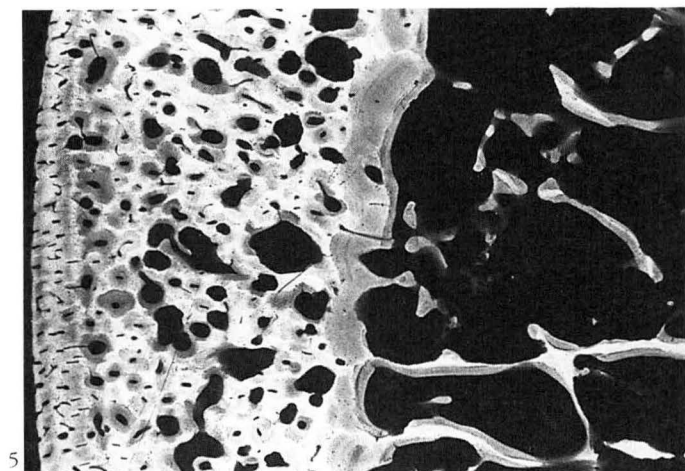
neos com baixo grau de mineralização sobre os de alto e médio grau. Constatou-se também que frequentemente formaram-se fendas entre o tecido bem mineralizado e o com teores menores de cálcio. Observou-se ainda que um maior número de osteôneos tinha o canal osteônico alargado, as lacunas dos osteócitos apresentavam-se aumentadas e que a compacta tornava-se mais fina com o evoluir da doença (Fig. 5 a 8).

Em seguida resumimos os achados microrradiográficos e histológicos nas costelas dos bovinos examinados.

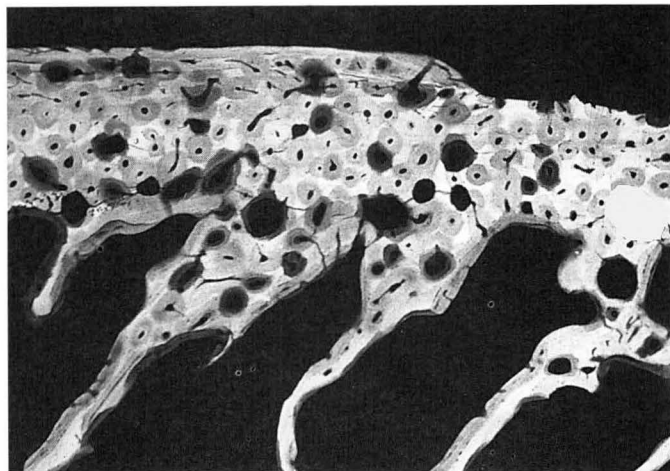
#### *Bovinos em crescimento* (Quadro 1)

Os oito animais deste grupo tinham idades diferentes e a remodelação da compacta laminar juvenil em sistemas de osteôneos tinha evolução variável. A remodelação em osteôneos de três animais ainda não tinha se iniciada. Em cinco animais até dois terços da compacta lateral eram re-

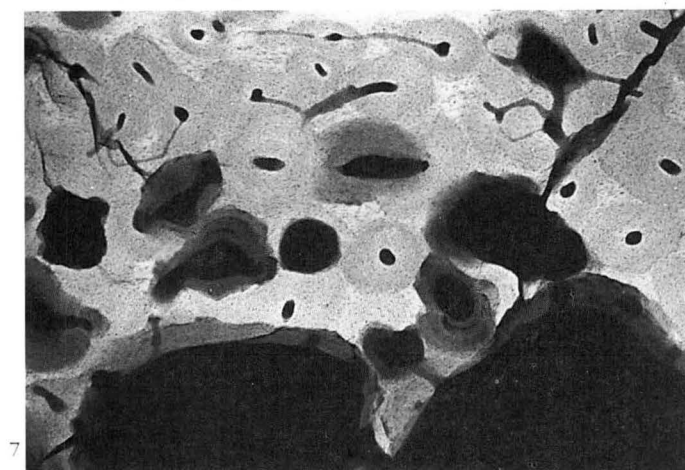
modelados em osteôneos. A remodelação em osteôneos era sempre menos evidente na compacta pleural. As lamelas especiais dos osteôneos eram, na maioria dos ossos, densamente mineralizadas e deixavam reconhecer uma zona marginal mais mineralizada na lamela interna do canal vascular (bordo de absorção). Nos osteôneos com canal de Havers alargado as lamelas especiais eram menos mineralizadas que as lamelas intersticiais. Em poucos espaços largos de Havers havia lacunas de reabsorção. Em canais de Havers largos com aposição de tecido ósseo lamelar ocorriam bainhas osteóides com 9,2 a 17,7 $\mu$ m de largura. Na superfície periostal formavam-se lamelas tangenciais interligadas por lamelas radiais curtas. Na compacta lateral e pleural encontrava-se uma lamela geral endostal. Nos animais mais jovens a lamela geral ainda não tinha se formada completamente. Também observava-se reabsorção endostal por osteoclastos no sentido ex-



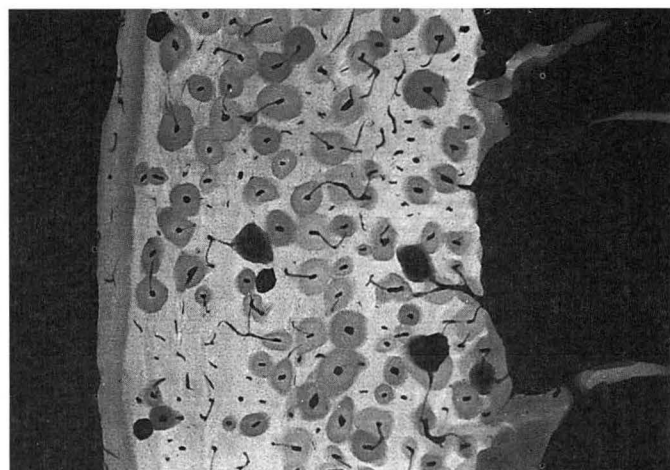
5



6



7



8

Fig. 5. Numerosos canais de Havers alargados e lamelas especiais e gerais fracamente mineralizadas. Corte transversal de costela de bovino em crescimento (juvenil) com osteomalácia. Microrradiograma, obj. 2,5.

Fig. 7. Canais de Havers alargados e revestimento das lacunas de reabsorção por tecido ósseo fracamente mineralizado. Corte transversal de costela de bovino com osteomalácia. Microrradiograma, obj. 10.

Fig. 6. Canais de Havers alargados e lacunas de reabsorção com tecido ósseo fracamente mineralizado. Corte transversal de costela de bovino adulto com osteomalácia. Microrradiograma, obj. 2,5.

Fig. 8. Osteôneos com canais de Havers estreitos e lamelas especiais apresentando médio e alto níveis de mineralização. Corte transversal de costela de bovino adulto sem osteomalácia. Microrradiograma, obj. 2,5.

cêntrico, sob forma focal. As lamelas gerais eram uniformemente mineralizadas e cobertas em alguns pontos por bainhas osteóides com 8,7 a 14,4 $\mu$ m de espessura. As trabéculas esponjosas tinham, em certos trechos, bainhas osteóides com 6,1 a 16,8 $\mu$ m de espessura. Em dois bovinos as bainhas osteóides eram muito finas não sendo possível determinar sua espessura.

Resumindo pode se constatar que, nos bovinos ainda em crescimento, foram verificadas diferenças de estrutura nas costelas examinadas que somente existiam em face das diferenças de idade dos animais. A mineralização do tecido ósseo aconteceu regularmente. A espessura das bainhas osteóides nos canais de Havers, bem como nas lamelas gerais e nas trabéculas esponjosas não podia ser interpretada como sinal de um distúrbio de mineralização no sentido de osteomalácia.

#### *Bovinos adultos* (Quadro 2)

Neste grupo de seis animais a compacta mostrou uma lamela geral estratificada externa e interna. A compacta lateral de quatro animais era inteiramente transformada em osteôneos, de maneira que as lamelas intersticiais quase não eram perceptíveis. Em dois animais somente os dois terços internos da compacta tinham estrutura de osteôneos. Na compacta pleural de três animais ambos os terços internos e, de três animais, o terço interno eram transformados em osteôneos. As partes da compacta lateral e pleural que ainda não eram transformadas em osteôneos, consistiram de lamelas radiais e tangenciais. Em relação ao grau de mineralização dos osteôneos, em três animais observaram-se sobretudo osteôneos de teor mineral alto e, em três animais, osteôneos de conteúdo mineral médio. A maioria dos osteôneos mostraram um bordo de absorção clara-

Quadro 1. Bovinos em crescimento que possuíram estrutura óssea normal, de acordo com a sua idade

Animal n <sup>o</sup>	Frequência de osteôneos com canais de Havers estreitos, largos e alargados, no dorso das costelas	Espessura das bainhas osteóides (µm)		
		Canal de Havers	Lamela geral	Superfície da esponjosa
1113	3:1:1	12,7	14,0	13,7
1115	- <sup>c</sup>	17,7	9,6	10,2
1116	3:1:1	9,7	14,4	9,7
1121	2:2:1	7,8	9,2	6,1
1120b	2:1:1	12,0	8,9	16,8
1120c	- <sup>c</sup>	9,2	8,7	9,7
1333	1:1:1	- <sup>d</sup>	-	-
1083	- <sup>c</sup>	- <sup>d</sup>	-	-

<sup>a</sup> Na superfície periosteal ainda há formação de lamelas radiais e tangenciais.

<sup>b</sup> Espessura (µm) das bainhas osteóides nos canais de Havers, na lamela geral interna e nas trabéculas esponjosas.

<sup>c</sup> Os animais apresentavam compacta juvenil não se estabelecendo relação entre os canais de Havers.

<sup>d</sup> A espessura da bainha de osteóide era muito fina não sendo medida.

Quadro 2. Bovinos adultos que possuíram estrutura óssea normal<sup>a</sup>

Animal n <sup>o</sup>	Frequência de osteôneos com canais de Havers estreitos, largos e alargados, no dorso das costelas	Espessura das bainhas osteóides (µm) <sup>b</sup>		
		Canal de Havers	Lamela geral	Superfície da esponjosa
1118	3:1:1	18,6	17,6	17,6
1119	3:1:1	20,5	18,8	20,9
1120f	3:1:1	19,0	17,8	15,2
1120g	2:1:1	13,3	14,1	12,1
1120i	3:2:1	10,4	12,2	10,0
1123a	3:1:1	13,7	113,5	14,4

<sup>a</sup> A compacta da costela está fechada através da lamela geral externa e interna estratificada.

<sup>b</sup> Espessura (0m) das bainhas osteóides nos canais de Havers, na lamela geral estratificada.

mente reconhecível da lamela especial interna. Nitidamente predominavam os osteôneos com canais de Havers estreitos. Um animal mostrou grande número de canais de Havers também largos. Além disso também existiam raros canais de Havers com lacunas de reabsorção. As bainhas osteóides dos canais de Havers largos, com aposição de tecido ósseo lamelar, tinham uma espessura de 10,4 a 20,5µm. As lamelas especiais dos osteôneos com canais vasculares largos mostravam teor mineral médio. A superfície interna da compacta em dois animais era coberta por uma lamela geral estreita, em dois animais por uma lamela geral de largura média e em dois animais por lamela geral larga. Em todos os animais, as lamelas gerais mostravam teor mineral médio e tinham bainhas osteóides com 12,2 a 18,8µm de largura. Em alguns pontos as lamelas gerais eram desgastadas sob forma de lacunas pelos osteoclastos. Nas trabéculas esponjosas observaram-se, em certos trechos, bainhas osteóides com espessura de 10,0 a 20,0µm. Nas trabéculas esponjosas também ocorreram lacunas de Howship.

Resumindo, pode se verificar que os bovinos desse grupo mostraram estruturas que corresponderam a uma com-

compacta de costela após término de crescimento. As bainhas osteóides eram mais largas que as nos animais em crescimento do grupo anterior.

#### *Bovinos jovens e adultos com osteomalácia (Quadro 3)*

Neste grupo são descritos os resultados de dez animais, em conjunto. Cinco animais (1117,1120e, 1122a, 1122b, 1123b) mostram uma compacta ainda em crescimento com formação subperiosteal de lamelas radiais e tangenciais. A compacta de um destes animais consistiu de tecido ósseo juvenil com canais vasculares estreitos e sob a forma de fendas. Nos outros quatro animais a compacta lateral e pleural até dois terços estava transformada em osteôneos. Nos cinco animais restantes (1120a, 1120d, 1120h, 1334, 1335) a compacta era fechada por uma lamela geral estratificada externa e outra interna. Neste casos a largura da lamela geral era variável. A lamela geral externa tinha um teor mineral mais baixo que as lamelas intersticiais. Nesses cinco animais a compacta era em grande parte transformada em osteôneos. Nas costelas com transformação parcial ou completa em osteôneos, ocorreram frequentemente osteôneos com lamelas especiais fraca-

Quadro 3. Bovinos jovens e adultos que tiveram alterações de osteomalácia

Animal n <sup>o</sup>	Frequência de osteôneos com canais de Havers estreitos, largos e alargados, no dorso das costelas	Espessura das bainhas osteóides (µm) <sup>a</sup>		
		canal de Havers	Lamela geral	Superfície esponjosa
1117 (jovem)	1:2:1	17,2	19,8	26,7
1120e (jovem)	2:2:1	18,6	25,9	27,5
1122a (jovem)	1:2:1	19,4	16,3	17,4
1122b (jovem)	1:3:2	13,2	14,5	15,4
1123b (jovem)	0:1:2	12,6	17,3	19,2
1120a (adulto)	3:2:1	15,2	16,9	15,8
1120d (adulto)	3:2:1	16,6	11,5	13,6
1120h (adulto)	2:2:1	12,9	19,5	18,2
1134 (adulto)	3:2:1	17,3	23	18,8
1135 (adulto)	3:2:1	12,4	18,1	18,1

<sup>a</sup> Espessura (µm) das bainhas osteóides nos canais de Havers bem como na lamela geral interna e nas trabéculas esponjosas.

mente mineralizadas, enquanto que em cinco animais eram os osteôneos fracamente mineralizados mais frequentes que os osteôneos de teores minerais médio e alto. Em todos os nove animais observaram-se osteôneos com duas camadas diferentes, uma com lamelas especiais internas mais acentuadamente mineralizadas e outra, com lamelas especiais externas mais fracamente mineralizadas. As lamelas especiais variavelmente mineralizadas haviam sido separadas por uma linha fortemente mineralizada ("Kittlinie"). Frequentemente havia fendas entre essas camadas lamelares. Em sete animais havia somente alguns poucos destes osteôneos com as duas camadas, em dois animais esses eram mais numerosos. Os osteôneos de conteúdo mineral mais baixo não deixaram reconhecer bordos de mineralização mais acentuada. Em todos os animais osteôneos com canais vasculares alargados eram presentes em número variável. Os canais vasculares em poucos osteôneos também eram dilatados por osteoclasia. Em osteôneos com o canal de Havers largo e aposição de tecido ósseo lamelar, o tecido ósseo depositado era fracamente mineralizado e coberto por bainhas osteóides com 12,6 a 19,4µm de espessura. A compacta interna (endostal) de todos os animais era coberta de uma lamela geral variavelmente larga. As lamelas gerais tinham, nos dez animais, um teor mineral mais baixo. Quando as lamelas gerais no espaço medular eram constituídas de duas camadas, na camada interna o teor mineral era mais alto. Entre as camadas variavelmente mineralizadas das lamelas gerais internas havia frequentemente fendas. A superfície das lamelas gerais era quase completamente coberta de bainhas osteóides mineralizadas com 11,5 a 25,9µm de espessura. A superfície das trabéculas esponjosas era formada de tecido ósseo fracamente mineralizado que era quase completamente coberto de bainhas osteóides com espessura de 13,6 a 27,5µm.

Resumindo, pode-se verificar que as costelas dos dez animais mostraram diferenças ligadas à idade. Os achados patomorfológicos corresponderam aos de osteomalácia. O tecido ósseo formado durante a evolução do

processo mostrou duas formas de alteração. Quando o tecido mineralizou, o teor mineral ficou baixo. Quando o tecido ósseo em formação não mineralizou, bainhas osteóides cobriram quase inteiramente a superfície endostal das costelas com espessura de até 27,5µm. A osteogênese era hipoplásica em graus variáveis, assim que os espaços internos lentamente se alargaram durante a remodelação.

## DISCUSSÃO

Dos 24 bovinos examinados neste estudo dez apresentaram alterações de osteomalácia que caracteriza-se pela não-mineralização do tecido osteóide, do novo osso em formação. Nos animais em crescimento encontra-se tecido osteóide principalmente na superfície periosteal e na superfície endostal. Em animais adultos encontra-se tecido osteóide sobretudo nos locais de remodelamento interno, isto é, nas trabéculas esponjosas e nos canais de Havers.

Para o diagnóstico de osteomalácia foram consideradas a espessura da camada de osteóide e a extensão da bainha de osteóide sobre a superfície interna do osso, a superfície das trabéculas ósseas e dos canais de Havers. Este último critério mostrou-se mais eficiente no diagnóstico da deficiência crônica de fósforo, uma vez que as colunas de osteóide estendem-se por uma superfície maior do que nos animais sem deficiência. A espessura da bainha não mostrou-se tão eficiente no diagnóstico; isso deve-se provavelmente ao fato que a deficiência de fósforo normalmente está acompanhada de deficiência de energia e proteína, havendo com isso menor deposição de tecido ósseo pelos osteoblastos (Palmer 1992). Há nestas circunstâncias um afinamento da compacta e um maior número de canais de Havers alargados com o evoluir da doença.

Sugerimos que a metodologia utilizada poderia ser aproveitada, no Brasil, na avaliação da eficácia da suplementação de fósforo em rebanhos bovinos criados em regime extensivo de campo em regiões com solos deficientes neste elemento.

*Agradecimentos.*- Ao Dr. Ivan Valadão Rosa, Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, pelas informações e estímulo dados para a realização do presente trabalho.

#### REFERÊNCIAS

- Döbereiner J., Tokarnia C.H., Langenegger J. & Dutra I.S. 1992. Epizootic botulism of cattle in Brazil. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 99(5):188-190.
- Dutra I.S., Weiss H.E., Weiss H. & Döbereiner J. 1993. Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. *Pesq. Vet. Bras.* 13(3/4):83-86.
- Palmer N. 1992. Bone and joints, p. 1-181 In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed.) *Pathology of Domestic Animals*. 4th ed. Academic Press, San Diego.
- Romeis B. 1989. *Mikroskopische Technik*. 17., neubearbeitete Auflage. Hrsgb. P. Böck. Urban & Schwarzenberg, München, S. 499-500.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J & Moraes S.S. 1988. Situação atual e perspectivas da investigação sobre nutrição mineral em bovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 8(1/2): 1-16.

## INFLUÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA ESTAFILOCÓCICA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E CELULARES DO LEITE<sup>1</sup>

Edmar Soares Nicolau<sup>2</sup>, Antonio Nader Filho<sup>3</sup>, Luiz Augusto do Amaral<sup>3</sup>  
e Oswaldo Durival Rossi Júnior<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Nicolau E.S., Nader Filho A., Amaral L.A., Rossi Júnior O.D. 1996. [**Influence of subclinical staphylococci mastitis on physical, chemical and cellular milk characteristics.**] Influência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(1):35-38. Depto Doenças e Inspeção de Carne, Leite e Produtos Derivados, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, "Campus de Itatiaia", Goiânia, GO 74410-000, Brazil.

One hundred twenty-six milk samples from 63 apparently healthy cows, but positive in the California Mastitis Test were submitted to determinations of pH, acidity, density, butter-fat, total solids, non-fat solids, cryoscopic point, caseine level, chloride level and polymorphonuclear leukocytes. Forty-one cows were infected by coagulase-positive *Staphylococcus* and 22 by coagulase-negative *Staphylococcus*. The results obtained in the milk sample analysis from the healthy quarters and infected by coagulase-positive *Staphylococcus* showed variations of all constituents investigated. However only the pH values (F=4.17\*) and the polymorphonuclear leukocytes (F=11.35\*\*) showed significant differences. On the other hand, between the milk samples from healthy quarters and infected quarters by coagulase-negative *Staphylococcus*, only the polymorphonuclear leukocytes (F=16.29\*\*) showed significant differences.

**INDEX TERMS:** Milk, subclinical mastitis, coagulase-positive *Staphylococcus*, coagulase-negative *Staphylococcus*.

**SINOPSE.-** Foram submetidas às determinações do pH, acidez titulável, densidade, teor de gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, ponto crioscópico, teor de cloreto, teor de caseína e às contagens de leucócitos polimorfonucleares, 126 amostras de leite procedentes de 63 vacas aparentemente sadias, porém, positivas ao Califórnia Mastitis Test, das quais 41 mostraram-se infectadas por cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e 22 por cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa. Apesar de ter sido observada a variação de todos os constituintes investigados entre as amostras de leite procedentes de quartos sadios e infectados por *Staphylococcus* coagulase positiva,

apenas os valores de pH (F=4,17\*) e das contagens de leucócitos polimorfonucleares (F=11,35\*\*), mostraram diferenças estatisticamente significativas. Por outro lado, verificou-se, também, que entre as amostras de leite oriundas de quartos sadios e infectados por *Staphylococcus* coagulase negativa, apenas os valores das contagens de leucócitos polimorfonucleares (F=16,29\*\*) apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Leite, mastite subclínica, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa.

### INTRODUÇÃO

Entre as 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros identificados como agentes etiológicos da mastite bovina, especial atenção deve ser dispensada aos cocos catalase e Gram positivos, tendo em vista que estas bactérias tem sido frequentemente isoladas tanto nas formas clínicas como nas subclínicas desta enfermidade (Watts 1988).

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 18 de janeiro de 1996.

<sup>2</sup> Departamento de Doenças e Inspeção de Carne, Leite e Derivados, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, "Campus de Itatiaia", Goiânia, GO 74410-000.

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Campus de Jaboticabal, Rodovia Carlos Tonanni Km 5, Jaboticabal, SP 14870-000.

Dentre os agentes etiológicos pertencentes a este grupo de microrganismos destacam-se os *Staphylococcus* coagulase positiva, principalmente em função da sua elevada ocorrência e patogenicidade. Por outro lado, os *Micrococcus* e outras 19 espécies de *Staphylococcus* representam os outros microrganismos deste grupo, que não evidenciam positividade no teste da coagulase (Kloss 1980).

Embora Braimley & Dodd (1984) tenham considerado os *Staphylococcus* coagulase negativa como pouco patogênicos ou apatogênicos na mastite bovina, vários autores tem reconhecido a sua importância como agentes etiológicos desta enfermidade (Verma 1977, Mardh 1978, Vianni 1986, Watts 1988, Vianni & Nader Filho 1990).

Tendo em vista o exposto e considerando a necessidade de maiores informações a este respeito, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de avaliar a influência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite secretado pelos quartos afetados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Propriedades rurais e rebanho bovino

Foram estudados 5 rebanhos produtores de leite tipo B, situados na região do Município de Monte Alto, Estado de São Paulo, com um população de cerca de 700 vacas lactantes da raça holandesa e mestiças, mantidas em sistema semi-intensivo de criação, as quais eram ordenhadas mecanicamente, duas vezes ao dias.

### California Mastitis Test

Foram submetidas ao California Mastitis Test (Schalm & Noorlander 1957), durante a ordenha da tarde, 658 vacas aparentemente sadias. Entre as 252 fêmeas positivas à esta prova, foram colhidos em tubos de ensaio esterilizados, cerca de 20ml de leite dos quartos reagentes, de acordo com as normas de assepsia propostas por Veisseyre (1972). Após o acondicionamento em caixas de material isotérmico ("isopor"), contendo cubos de gelo, estas amostras eram transportadas para os laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, "Campus" de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

### Isolamento e identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus*

As referidas amostras eram semeadas em placas de Petri contendo ágar Baird-Parker e incubadas a 37°C por 24/48 horas, quando procedia-se a verificação da presença de colônias negras, circundadas ou não por halo de precipitação, bem como a realização de esfregaços corados pelo método de Gram e do teste da catalase (American Public Health Association 1976).

As colônias que revelassem a presença de cocos Gram positivos dispostos sob a forma de cachos de uva e que evidenciassem positividade no teste da catalase, eram submetidas à prova da coagulase lenta com plasma de coelho (Holberg 1973). As cepas coagulase negativas eram submetidas, ainda, à prova de oxidação e fermentação da glicose em condições de aerobiose e de anaerobiose, com o intuito de diferenciar os gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* (Carter 1988).

### Seleção dos animais

A partir da referida identificação, foram selecionadas 63 vacas que apresentavam pelo menos um quarto positivo ao California

Mastitis Test e infectado por cepas *Staphylococcus*, simultaneamente à presença de pelo menos um quarto negativo à referida prova. Deste modo foram selecionadas 41 vacas infectadas por *Staphylococcus* coagulase positiva e 22 por *Staphylococcus* coagulase negativa.

### Amostras de leite

Foram colhidas assepticamente, duas amostras de leite de cada fêmea selecionadas, de modo que cada amostra representasse o produto oriundo dos quartos sadios e infectados, respectivamente. Para tanto, colhiam-se, através de realização de um "pool", cerca de 250ml de leite do(s) quarto(s) sadio(s) e infectado(s), respectivamente.

### Análises físico-químicas e celulares

As amostras de leite foram submetidas às determinações do pH, acidez titulável, densidade, extrato seco total, extrato seco desengordurado, ponto crioscópico (Ministério da Agricultura 1980), teor de cloretos (Amaral et al. 1988), teor de caseína (Wandek et al. 1977) e às contagens de leucócitos polimorfonucleares (Subcommittee on Screening Tests National Mastitis Council 1968).

### Método estatístico

Os dados obtidos foram enquadrados em delineamento inteiramente casualizado e submetidos à análise de variância pelo teste F (Gomes 1987).

## RESULTADOS

O Quadro 1 mostra a frequência de isolamento de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa entre as 63 fêmeas selecionadas em 5 rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Monte Alto/SP. Verifica-se que as referidas cepas foram isoladas das amostras de leite procedentes de 41 (65,1%) e de 22 (34,9%) fêmeas, respectivamente.

O Quadro 2 mostra os valores médios das determinações físico-químicas e celulares das amostras de leite de quartos sadios e infectados por cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa e determinação do percentual de variação. Apesar de ter sido observada a variação de todos os constituintes

Quadro 1. Frequência de isolamento de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa entre 63 fêmeas selecionadas em 5 rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Monte Alto, São Paulo

Rebanhos	Cepas de <i>Staphylococcus</i>				Total
	Coagulase positiva		Coagulase negativa		
	Nº	%	Nº	%	
A	16	25,4	7	11,1	23
B	6	9,5	6	9,5	12
C	10	15,9	2	3,2	12
D	8	12,7	4	6,4	12
E	1	1,6	3	4,8	4
Total	41	65,1	22	34,9	63

Quadro 2. Valores médios das determinações físico-químicas e celulares do leite de quartos sadios e infectados por cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa e determinação do percentual de variação em 5 rebanhos produtores de leite tipo B na região de Monte Alto, São Paulo

Características físico-químicas e celulares	Amostras de leite de quartos							
	Sadios	Infectados <sup>a</sup>	% Variação	F	Sadios	Infectados <sup>b</sup>	% Variação	F
Acidez (°D)	20,19	19,60	-2,92	0,76 <sup>NS</sup>	19,90	19,59	-1,56	0,15 <sup>NS</sup>
Densidade	1,0323	1,0311	-0,12	-0,92 <sup>NS</sup>	1,0323	1,0311	-0,12	1,96 <sup>NS</sup>
Teor de gordura (%)	2,70	2,69	0,37	0,69 <sup>NS</sup>	3,20	3,18	-0,62	0,00 <sup>NS</sup>
E.S.T. (%)	11,60	11,46	-1,21	0,33 <sup>NS</sup>	12,20	12,07	-1,07	0,01 <sup>NS</sup>
E.S.D. (%)	8,90	8,76	-1,57	1,49 <sup>NS</sup>	9,00	8,98	-0,22	0,56 <sup>NS</sup>
Crioscopia (°C)	-0,542	-0,544	-0,37	0,69 <sup>NS</sup>	-0,544	-0,547	-0,55	0,15 <sup>NS</sup>
Caseína (%)	2,529	2,421	-4,27	1,68 <sup>NS</sup>	2,526	2,511	-0,59	0,54 <sup>NS</sup>
pH	6,40	6,48	+1,23	4,17*	6,43	6,49	+0,92	1,05 <sup>NS</sup>
Teor de cloretos (%)	0,132	0,142	+7,04	3,39 <sup>NS</sup>	0,133	0,139	+4,32	0,35 <sup>NS</sup>
Leucócitos PMN/ml	282.720	6.636.720	+2.247,45	11,35**	189.966	+3.303.946	1.639,23	16,29**

<sup>a</sup> Cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva.

<sup>b</sup> Cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa.

<sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

investigados, verifica-se que entre os quartos sadios e infectados por cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, apenas os valores médios do pH (F=4,17\*) e da contagem de leucócitos polimorfonucleares (F=11,35\*\*) mostraram diferenças estatisticamente significativas. Por outro lado, verifica-se, também, que entre os quartos sadios e infectados por cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, apenas as contagens de leucócitos polimorfonucleares (F=16,29%) apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A análise dos dados constantes dos Quadros 1 e 2 demonstra que as amostras de leite procedentes dos quartos infectados por cepas *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa, quando comparadas às dos quartos sadios, apresentaram maiores valores médios nas determinações do pH, teor de cloretos e do número de leucócitos polimorfonucleares. Por outro lado, as referidas amostras apresentaram menores valores médios nas determinações da acidez, densidade, teor de gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, crioscopia e de caseína. Tais achados confirmam as tendências observadas por Cecilia (1980), Ferreiro et al. (1981), Kitchen (1981), Poutrel (1982), Vianni (1986), Timms & Schultz (1987), Amaral et al. (1988), Emanuelson & Wever (1989) e Vianni & Nader Filho (1990).

Os valores inseridos no Quadro 2 revelam que entre os vários constituintes analisados, as contagens de leucócitos polimorfonucleares foram as que apresentaram os maiores percentuais de variação, quais sejam, 2.247,45% e 1.639,23%, respectivamente. Vianni (1986), Timms & Schultz (1987) e Rainard et al. (1990) também constataram este fato, todavia, obtiveram percentuais de variação inferiores, quais sejam, 597,7% e 97,76%, 700,0% e 108,8% e de 1.142,5% e

524,9%, respectivamente. Acredita-se que as diferenças observadas entre os referidos percentuais talvez possam ser atribuídas a vários fatores, dentre os quais destacam-se as distintas características patogênicas das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas dos casos investigados.

Apesar de ter sido verificada a variação de todos os constituintes investigados, quando comparadas às amostras de leite procedentes de quartos sadios e infectados por cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Staphylococcus* coagulase negativa, apenas as contagens de leucócitos polimorfonucleares mostraram diferenças estatisticamente significativas para ambos os grupos de microrganismos, quais sejam, F=11,35% e F=16,29%, respectivamente. Tais achados vêm ratificar as afirmações de vários autores, segundo as quais a quantidade de leucócitos polimorfonucleares presentes no leite, constituiu-se no parâmetro mais seguro para a avaliação do estado sanitário da glândula mamária (Poutrel 1982, Toit et al. 1982, Timms & Schultz 1987, Rainard et al. 1990, Vianni & Nader Filho 1990).

Os achados deste trabalho talvez possam justificar a larga utilização dos métodos auxiliares de diagnóstico da mastite bovina que se fundamentam na avaliação do conteúdo leucocitário do leite, especialmente a do California Mastitis Test, que apesar de ter sido idealizado 39 anos atrás por Schalm & Noorlander (1957), ainda é amplamente empregado a nível de campo em praticamente todos os países do mundo.

### REFERÊNCIAS

- Amaral L.A., Nader Filho A., Lew B.J. 1988. Estudo da variação do teor de cloretos no colostro e no leite de vacas sadias. *Ars Veterinária* 4(1): 105-112.
- American Public Health Association 1976. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination*. Washington. 701p.

- Braimley A.J. & Dodd F.H. 1984. Review of the progress of dairy science; mastitis control progress and prospects. J. Dairy Sci. 51: 481-512.
- Carter G.R. 1988. Fundamentos de Bacteriologia e Virologia Veterinária. 3ª ed. Roca, São Paulo. 249p.
- Cecilia A.C. 1980. Enciclopédia de la Inspeccion Veterinária y Analisis de Alimentos. Calpe, Madrid. 1313p.
- Emanuelson V. & Wever P. 1989. Potential of differential somatic cell counts as indicators of mastitis in quarter milk samples from dairy cows. Acta Vet. Scand. 30: 464-474.
- Ferreiro L., Santos E.C., Silva M. 1981. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. UFMG 33(1): 36-45.
- Gomes F.P. 1987. Curso de Estatística Experimental. 12ª ed. Piracicaba, São Paulo. 467p.
- Holberg G.Y. 1973. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. Acta Vet. Scand. 45 (Suppl.): 1-144.
- Kitchen B.J. 1981. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis milk composition changes and related diagnostic test. J. Dairy Res. 48(5): 167-188.
- Kloss W.E. 1980. Natural population of germs *Staphylococcus*. Annu. Rev. Microbiol. 34: 559-592.
- Mardh P.A. 1978. Coagulase negative, novo-biocin-resistant *Staphylococcus* on the skin of animal and man, on meat and milk. Acta Vet. Scand. 19: 243-253.
- Ministério da Agricultura 1980. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II - Métodos físico-químicos. Secretaria Nacional de Defesa Animal, Brasília.
- Poutrel B. 1982. Susceptibility to mastitis: a review of factors related to the cow. Annales Rech. Vét. 13(1): 85-99.
- Rainard P., Ducelliel M. & Poutrel B. 1990. The contribution of mammary infections by coagulase negative *Staphylococcus* to the herd bulk milk somatic cell count. Vet. Res. Commun. 14(3): 193-198.
- Schalm O.W. & Noorlander D.D. 1975. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. J. Am. Vet. Med. Assoc. 130(5): 199-204.
- Subcommittee on Screening Tests National Mastitis Council 1968. Direct microscopic somatic cell count in milk. J. Milk Food Technol. 31(11): 350-354.
- Timms L.L. & Schultz L.M. 1987. Dynamic and significances of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. J. Dairy Sci. 70: 2648-2657.
- Toit F., Villiers P.A. & Smith A. 1982. Influence of bacterial infection of quarters on milk production and milk composition. S. Afr. J. Anim. Sci. 12(3): 369-374.
- Veisseyre R. 1972. Lactologia Técnica. Acribia, Zaragoza. 634p.
- Verma N.D. 1977. Bovine mastitis and *Staphylococcus epidermidis*. Indian J. Anim. Sci. 47(2): 73-78.
- Vianni M.C.E. 1986. Influência de agentes bacterianos da mastite subclínica bovina sobre as características físico-químicas do leite. Dissertação de Mestrado, Instituto de Veterinária Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro. 113p.
- Vianni M.C.E. & Nader Filho A. 1990. Variação das características físico-químicas e celulares do leite de vacas com mastite subclínica. Ciênc. Vet. 49(1): 4.
- Wandek F.A., Barros G.C., Matos Neto P.J. & Silva C.A.B. 1977. Análises do Leite e Derivados. Práticas de Laboratório. Itaguaí, Rio de Janeiro. 145p.
- Watts J.L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 16: 41-46.

## CROSS-REACTIONS BETWEEN *Yersinia enterocolitica* SEROTYPE 9 AND *Brucella* spp IN BOVINE AND SWINE SERA, IN THE AREA OF RIO DE JANEIRO<sup>1</sup>

Norma S. Lázaro<sup>2</sup> e Ernesto Hofer<sup>3</sup>

**SINOPSE.-** Lázaro N.S. & Hofer E. 1996. [Reações cruzadas entre *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e *Brucella* spp em soros de bovinos e suínos, na área do Rio de Janeiro.]

Cross-reactions between *Yersinia enterocolitica* serotype 9 and *Brucella* spp in bovine and swine sera, in the area of Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(1):39-43. Depto Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ 23851-970, Brazil.

O grau de interferência antigênica entre *Yersinia enterocolitica* O:9 e *Brucella* spp foi analisado em 245 soros de bovinos discriminados quanto ao estado de imunização contra brucelose, e 119 soros de suínos. Os espécimens foram submetidos às provas de soro-aglutinação rápida, soro-aglutinação lenta e antígeno acidificado para *Brucella* spp e soro-aglutinação lenta para *Y. enterocolitica* O:9. A resposta imune a *Y. enterocolitica* foi evidenciada e considerada significativa em relação aos seus possíveis efeitos na interpretação dos testes sorológicos para brucelose. Os títulos aglutinantes foram aproximados ou mesmo similares do ponto de vista quantitativo. Como não foi possível determinar com precisão, na maioria dos casos, o agente etiológico, é necessário instituir um método laboratorial de diagnóstico de brucelose que permita distinguir as infecções específicas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Yersinia enterocolitica*, *Brucella* spp, reação cruzada, bovino, suíno.

**ABSTRACT.-** The extent of antigen interference between *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Brucella* spp was evaluated in 245 bovine serum samples divided into groups according to status of immunization against brucellosis, and in 119 swine serum samples. The specimens were submitted to the plate serum agglutination test, tube serum agglutination test and to the Rose Bengal test for *Brucella* spp, and to tube serum agglutination for *Y. enterocolitica* O:9. The immune response to *Y. enterocolitica* was demonstrated and considered significant in terms of its possible effects on the interpretation of serological tests for brucellosis. Agglutinating titers were close or even similar from a quantitative viewpoint. Since in most cases it was not possible to determine precisely the etiologic agent, it is clearly necessary to set up a laboratory method for the diagnosis of brucellosis that will permit the distinction of specific infections.

**INDEX TERMS:** Brucellosis, Yersiniosis, cross-reaction, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Brucella* spp.

### INTRODUCTION

*Yersinia enterocolitica* O:9 is a microorganism that paradoxically is of importance in Veterinary Medicine not because of its occurrence in animals, but because of its antigenic relationship with *Brucella* (Ahvonen et al. 1969). The two microorganisms share a somatic antigen, so that the immune response of animals exposed to *Y. enterocolitica* O:9 will be difficult to distinguish from that induced by *Brucella abortus* (Corbel & Cullen 1970, Hurvell 1973). This fact implies the elimination of animals with false-positive results, especially in countries in which measures for the eradication of brucellosis are based on serological tests.

In view of the marked prevalence of brucellosis among Brazilian herds, the objective of the present study was to evaluate the extent of antigenic interference between *Y. enterocolitica* O:9 and *Brucella* spp in cattle and swine using the techniques routinely employed for the serological diagnosis of brucellosis and yersiniosis.

<sup>1</sup> Accepted for publication on January 26, 1996.

<sup>2</sup> Depto Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ 23851-970, Brazil.

<sup>3</sup> Depto Bacteriologia, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling

A number of 245 serum samples from cattle and 119 from swine raised in various regions of the State of Rio de Janeiro, Brazil, were analyzed. An important aspect of the study was to characterize and distinguish samples from animals that had been immunized or not against brucellosis. Thus, 185 serum samples from non-vaccinated cattle of different age ranges and 60 from vaccinated cattle at the age of  $\geq 30$  months were studied.

The sera were inactivated at 56°C for 30 minutes on a water bath stored at -20°C until the time for use.

### Antigens

*Brucella abortus* - for the plate and tube agglutination test antigens were prepared and standardized at the Zoonoses Laboratory of the Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, according to the technique recommended by WHO (Alton et al. 1977). In addition to the two classical tests, acidified and Rose Bengal-stained antigen was used, sold by Becton, Dickinson and Company (USA) under the generic name of Card Test (CT).

*Yersinia enterocolitica* O:9 - strain M.Y. 79 (biotype 3, serotype 9, undetermined phagotype), were used, kindly provided by Prof. S. Winblad, Institute of Clinical Bacteriology, Malmoe, Sweden. Somatic antigen was obtained by the technique recommended by Hofer (see Lázaro 1980).

### Serological tests

Serum agglutination for *Brucella* spp - the plate (rapid) and tube (slow) serum agglutination techniques (PSA and TSA) were carried out and interpreted according to the recommendations of Alton et al. (1977). The Card Test was performed as recommended by Nicoletti (1967).

In the rapid and slow tests, agglutinating titers  $\geq 100$  and  $\geq 80$  were considered to be positive for non-vaccinated cattle, and agglutinating titers  $\geq 200$  and  $\geq 160$  were considered to be positive for vaccinated animals. The positivity threshold for swine was  $\geq 50$  and  $\geq 40$  for the two tests, respectively. In the Card Test, only the presence or absence of agglutination was considered.

The TSA for *Y. enterocolitica* O:9 was performed as done for *Brucella* spp, with the following modifications: the serum-antigen system was incubated for two hours at 50°C (water bath) and further incubated for 22 hours at 37°C. Reactions with titers  $\geq 80$  were considered to be positive.

## RESULTS

The data in Table 1 show that the results of the TSA tests for *Brucella* sp and *Yersinia enterocolitica* O:9 (38 sera) were analogous, whereas in vaccinated animals, slow serum agglutination and CT presented similar results (4 positive sera). In swine, the PAS (35 sera), CT (30 sera) and TSA tests for *Y. enterocolitica* O:9 (32 positive sera) were characterized by homogeneous results, with the largest number of *Brucella*-positive animals being detected with TSA (59 sera).

In the different associations investigated with respect to the tests for *Brucella* and *Y. enterocolitica* O:9, a predominance of sera reacting to *Y. enterocolitica* O:9 was observed in vaccinated and non-vaccinated cattle. In these associations, the nonparametric chisquare test showed a significant difference at the 1% level of probability ( $p < 0.01$ ). In

this case, we assumed a predominance of infection with *Y. enterocolitica* O:9, even though antigenic interference between *Brucella* sp. and *Y. enterocolitica* was demonstrated.

With respect to the TSA test for non-vaccinated cattle and the PSA and CT tests for swine, no significant difference in pattern was observed, i.e., there was no prevalence of a given agent over the other.

The TSA test for *Brucella* in swine sera showed a significant difference for *Brucella* sp, with no serum reacting only to *Y. enterocolitica* O:9.

Finally, Table 3 shows that in the positivity pattern revealed by the four tests, swine presented a much higher percentage than did cattle. However, in contrast to cattle, no swine serum presented an individual reaction to *Y. enterocolitica* O:9, but reacting sera were always positive to both *Y. enterocolitica* and *Brucella* spp.

In the overall analysis, considering the 129 sera that reacted with any one of the antigens employed, 60 showed cross-reactions between *Brucella* and *Y. enterocolitica* O:9. It should also be pointed out that 46 sera presented positive reactions with one of the *Brucella* antigens and 23 others revealed specificity for *Y. enterocolitica* O:9.

## DISCUSSION

A careful analysis of Table 1 shows that in both cattle classes (vaccinated and non-vaccinated animals) the CT showed higher percentages of positive reactions than PSA. This was mainly due to the reduction of titers in PSA with the inclusion of suspected animals (1:50 and 1:100, respectively) in the negative group. However, among the samples tested by CT, some reacted positively as a function of the immunoglobulin class involved since, according to Morgan et al. (1969) and Levieux (1974), IgG's play a fundamental role in the Rose Bengal test.

Another interest point regarding vaccinated animals was the low rate of sera reacting to *Brucella*, in contrast to the higher percentage of animals that reacted to *Yersinia enterocolitica* O:9. In this case, one cannot state that these animals were infected by *Y. enterocolitica* since this result very probably was due to animals with 1:200 I (incomplete) titer in PSA and 1:160 I in TSA, which were considered suspected according to the criterion of interpretation for vaccinated animals and that in the present study were included in the negative class.

On the other hand, when the results for the 60 sera from vaccinated cattle are considered individually, it can be seen that among those positive to *Y. enterocolitica* O:9 one animal was positive by CT but showed very low titers in the PSA and TSA tests (1:25 and 1:40, respectively). We may propose that the animal was previously infected with *Y. enterocolitica* O:9, although the natural occurrence of this microorganism in cattle is relatively rare (Gueraud et al. 1995, Hilbink et al. 1995). Conversely, there are many reports of data obtained by experimental infection that agree with the above problem (Corbel & Cullen 1970, Mittal et al. 1980, Mathias et al. 1988).

Table 1. Frequency of sera from cattle vaccinated or not against brucellosis and from swine that reacted positively to *Brucella* spp and *Yersinia enterocolitica* serotype 9

Tests	Cattle				Swine	
	Non-vaccinated		Vaccinated		React. (%)	Pos. (%)
	React. (%)	Pos. (%)	React. (%)	Pos. (%)		
PSA	52 (28.1)	10 (5.4)	06 (10.0)	01 (1.7)	46 (38.6)	35 (29.4)
TSA	127 (68.6)	38 (20.5)	27 (45.0)	04 (6.7)	71 (59.7)	59 (49.6)
Card Test	-	20 (10.8)	-	04 (6.7)	-	30 (25.2)
<i>Y. enterocolitica</i> O:9	104 (56.2)	38 (20.5)	36 (60.0)	13 (21.7)	73 (61.3)	32 (26.9)

React. = Reactor

Pos. = Positive

PSA (Plate serum agglutination)

TSA/Ba/Y.e.9 (Tube serum agglutination)

PSA =  $\geq 1:25$ 

Cattle non-vaccinated

 $\geq 1:100$  $\geq 1:80$ TSA  $\geq 1:20$ 

Cattle vaccinated

 $\geq 1:200$  $\geq 1:160$ 

Swine

 $\geq 1:50$  $\geq 1:40$ Table 2. Behavior of cattle and swine sera in the presence of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 antigens

Animals	<i>Y. enterocolitica</i> O:9 reaction	<i>Brucella</i> spp					
		PSA		TSA		CT	
		+	-	+	-	+	-
Cattle non-vaccinated	-	3	144	17	130	2	145
	+	7	31	21	17	18	20
	$X^2$	23.05 <sup>a</sup>		0 <sup>n.s.</sup>		14.08	
Cattle vaccinated	-	-	47	-	47	-	47
	+	1	12	4	9	4	9
	$X^2$	12		9		9	
Swine	-	10	77	27	60	5	82
	+	25	07	32	0	25	7
	$X^2$	0.53 <sup>n.s.</sup>		27.0		0.33 <sup>n.s.</sup>	

<sup>a</sup> At the 1% level of probability ( $p < 0.01$ ).

PSA - Plate serum agglutination test.

TSA - Tube serum agglutination test.

CT - Card Test.

Among the anomalous reactions was that of a vaccinated cow with a 1:160 titer in TSA and negative result in CT, and another with 1:40 titer in TSA but positive to CT and revealing titers of 1:1280 and 1:80, respectively, in relation to *Y. enterocolitica* O:9.

Table 2 shows that of the sera from 41 non-vaccinated cows that reacted with one of the antigens, 31 exclusively reacted to *Y. enterocolitica* O:9. Perhaps an explanation for this occurrence was the negative titer of animals with suspected reaction in the PSA test. With respect to the vaccinated cattle, only one of the 13 sera reacting to *Y. enterocolitica* was also positive for *Brucella* in the PSA test.

Analysis of the results for the 119 swine in the PSA and CT shows that 25 sera were positive for both microorganisms, whereas a relatively small number reacted separately to *Brucella* and/or *Y. enterocolitica* O:9. The CT was positive in almost all samples when PSA or TSA, or both,

were positive. Nicoletti (1967) stated that the Card Test is the most efficient process for the screening of infected swine when all the members of a herd are analyzed.

The TSA test, in addition to demonstrating antigenic interference, showed the predominance of *Brucella* infection (59 pigs) since no animal reacted only to *Y. enterocolitica* O:9.

The above data suggest that the combination of TSA for *Brucella* with TSA for *Y. enterocolitica* for non-vaccinated cattle does not distinguish between animals infected with only one of the two agents. Despite the evidence for antigenic interference, the possibility of greater involvement by *Y. enterocolitica* O:9 was clear for vaccinated cows, whereas infection with *Brucella* spp predominated among swine.

The data for non-vaccinated cattle show that the combination of CT with serum agglutination for *Y. enterocolitica* characterized the predominance of *Yersinia* without

Table 3. Distribution and frequency of the reactive patterns of positive cattle and swine sera in the presence of *Brucella* spp (PSA-TSA-Card Test) and *Yersinia enterocolitica* serotype 9 antigens

Techniques <sup>a</sup>				Animals									
				Cattle				Swine				Total	
				Non-vaccinated		Vaccinated		No.		%		No.	%
PSA	TSA	CT	Y.e.9	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%		
-	-	-	-	128	69.18	47	78.33	60	50.42	235	64.56		
+	+	+	+	7	3.78	1	1.66	24	20.16	32	8.79		
-	+	-	-	15	8.10	-	-	16	13.44	31	8.51		
-	-	-	+	15	8.10	8	13.33	-	-	23	6.31		
-	+	+	+	9	4.86	2	3.33	1	0.84	12	3.29		
-	+	-	+	5	2.70	1	1.66	6	5.04	12	3.29		
+	+	-	-	1	0.54	-	-	6	5.04	7	1.92		
-	-	+	+	2	1.08	1	1.7	-	-	3	0.82		
+	-	-	-	1	0.54	-	-	-	-	1	0.27		
-	-	+	-	1	0.54	-	-	-	-	1	0.27		
-	+	+	-	-	-	-	-	1	0.84	1	0.27		
-	+	+	-	1	0.54	-	-	4	3.33	5	1.37		
+	+	-	+	-	-	-	-	1	0.84	1	0.27		
Total				185	99.96	60	99.98	119	99.94	364	99.94		

<sup>a</sup> As indicated in Table 1.

masking the antigenic interference of *Brucella*. These results were also observed for vaccinated cattle, with a higher frequency of animals reacting to TSA, CT and *Y. enterocolitica* O:9 compared to PSA. In the analysis of this aspect, it is important to consider the participation of the evolutionary stage of the infection and/or disease, basically considering that TSA has limitations during the incubation and chronic phases of the disease, and also in the presence of vaccination (Morgan et al. 1969) and that the Card Test can recognize reacting animals before they are detected by TSA, although it does not discriminate between infected animals and animals immunized with agglutinogenic vaccine (Nicoletti 1967, Morgan et al. 1969, Pilet et al. 1972).

In the present study, in view of the age when the animals were tested, positive reactions to the different tests possibly originated from later infection with *Brucella* or *Y. enterocolitica* O:9 and not due to agglutinins of the vaccine. It should be pointed out that a vaccinated cow with a 1:80 titer in SSA, and therefore positive for brucellosis, presented the same titer for *Y. enterocolitica* O:9 and was then defined as positive, although this reaction was attributed to cross-antigenicity. However, we obtained sera with 1:320 and 1:160 titers for *Y. enterocolitica* O:9, which reacted at 1:20 and 1:40 in TSA, respectively, and did not react in PSA, indicating a probable infection with *Y. enterocolitica* O:9. We also observed that three sera that showed 1:80 titers for *Y. enterocolitica* O:9 did not react in the other tests.

On the basis of these results, one may admit that under natural conditions the animals infected with *Yersinia enterocolitica* O:9 may react or not to *Brucella* depending on the evolutionary phase of the infection.

Corbel (1973) pointed out that the antibodies that cross-react in the serum of cattle inoculated with *Yersinia*

*enterocolitica* O:9 are qualitatively similar to those of *Brucella* spp but become differentiated in chronological order, undergoing a rapid decline.

Several techniques for the distinction between the infection caused by the two etiological agents have been investigated. Corbel & Cullen (1970) reported that cattle and rabbits immunized with *B. abortus* and *Y. enterocolitica* present a cross-reaction in the Rose Bengal plate tests and that only a quantitative test using suspensions of *B. abortus* and *Y. enterocolitica* O:9 stained with Rose Bengal permitted the specification of the immunologic action of the two bacteria.

By inoculating cattle with *Y. enterocolitica* O:9, Mittal & Tizard (1979, 1980) demonstrated that homologous titers were consistently higher than heterologous titers in the microplate serum agglutination test using tetrazolium-stained antigens.

Das & Paranjape (1987), in a study using the quantitative plate test with a somatic (O) and flagellar (H) somatic antigen of *Y. enterocolitica* O:9, stabilized and stained with Rose Bengal, reported that antigen H of *Y. enterocolitica* O:9 was the only process capable of differentiating between the serological responses of the two microorganisms. Similarly, Mathias et al. (1987) reported that the determination of agglutinating and complement-fixing antibodies against the somatic antigens of the two bacteria and against the flagellar antigen of *Y. enterocolitica* O:9 permits the differentiation between brucellosis and yersiniosis in experimentally infected animals.

Finally, the multiple reaction profiles presented in Table 3 show that swine were the animals that presented the highest rate of sensitization by *Brucella* sp, followed by unvaccinated cattle. Vaccinated cattle did not react to any

of the *Brucella* tests except when the tests were combined with those for *Y. enterocolitica*. Reactions to low titers were observed, but did not reach positivity. These reactions probably originated from vaccination.

In terms of the response to the *Y. enterocolitica* O:9 antigen only, vaccinated cattle showed the highest sensitization (13.3%), followed by non-vaccinated cattle (8.10%), whereas swine did not react separately but presented agglutinins only in the tests combined with those for *Brucella* spp.

In summary, CT and PSA gave more conclusive results for a specific diagnosis in swine, whereas PSA detected fewer cross-reacting animals among cattle.

The immune response to *Y. enterocolitica* O:9 was demonstrated and considered to be significant with respect to its possible effects on the interpretation of serological tests for brucellosis. The agglutinating titers were close or even similar from a quantitative viewpoint and in most cases the etiologic agent could not be precisely determined. A laboratory method for the diagnosis of brucellosis that will permit to distinguish between specific infections is definitely needed.

*Acknowledgements.*- The authors thank Dr. Dália dos Prazeres Rodrigues, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, for her valuable technical assistance.

#### REFERENCES

- Ahvonon P., Janson E. & Aho K. 1969. Marked cross agglutination between *Brucellae* and a subtype of *Yersinia enterocolitica*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 75:291-295.
- Alton G.G., Jones L.M. & Pietz D.C. 1977. La brucellose techniques de laboratoire. 2<sup>ième</sup> éd. Genève. Organization Mondiale de la Santé (Ser. Mon. no. 55), p. 68-76.
- Corbel M.G. 1973. The nature of the antibody response to *Yersinia enterocolitica* in cattle. J. Hyg. 71:309-323.
- Corbel M.J. & Cullen G.A. 1970. Differentiation of the serological response to *Yersinia enterocolitica* and *Brucella abortus* in cattle. J. Hyg. 68:519-530.
- Das A.M. & Paranjape V.L. 1987. A stabilized Rose Bengal antigen plate test for differentiation of serological response evoked by *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 and *Brucella abortus* in bovine sera. Indian J. Anim. Sci. 57: 633-638.
- Guerand J.M., Garin-Bastuji B., Cau C., Connetable N., Jourdain D., Laubier S., Sarton C. & Thiebaut M. 1995. Isolement de *Yersinia enterocolitica* O:9 à partir de prélèvements d'avortement chez une vache présentant une réaction sérologique positive en brucellose. Bull. Acad. Vét. de France 68: 75-80.
- Hilbink F., Fenwick S.G., Thompson E.J., Kittelberger R., Penrose M. & Ross G.P. 1995. Non-specific seroreactions against *Brucella abortus* in ruminants in New Zealand and the presence of *Yersinia enterocolitica* O:9. N. Z. Vet. J. 43: 175-178.
- Hurvell B. 1973. Serological cross-reaction between different *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica* agglutinating activity of 19S and 7S antibodies against somatic antigen of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* type IX. Acta Vet. Scand. 14: 474-488.
- Lázaro N.S. 1980. Reações sorológicas cruzadas entre *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e *Brucella* sp em bovinos e suínos. Tese de Mestrado, UFMG, Belo Horizonte. 72p.
- Levieux D. 1974. Bovine immunoglobulins and brucellosis I:II. Ann. Rech. Vét. 5: 332-353.
- Mathias L.A., Pinto A.A., Girio R.J.S. & Irino K. 1987. Diferenciação entre infecção experimental por *Brucella abortus* e por *Yersinia enterocolitica* sorogrupo 09 em cobaias, através das provas de soroaglutinação e de fixação de complemento. Ars Vet. 3: 55-62.
- Mathias L.A., Pinto, A.A., Girio, R.J.S. & Perecin, D. 1988. Use of complement fixation test in the differentiation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serogroup 09 experimental infection in bovine. Revta. Microbiol. 19: 148-154.
- Mittal K.R. & Tizard I.R. 1979. Experimental studies on the serologic relationships between *Yersinia enterocolitica* and *Brucella abortus*. Res. Vet. Sci. 27: 354-360.
- Mittal K.R. & Tizard I.R. 1980. The microplate agglutinate test. A simple technique to assist in the differentiation of bovine brucellosis and Yersiniosis. Vet. Rec. 106: 403-405.
- Mittal K.R., Barnum D.A. & Tizard I.R. 1980. Experimental infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* serotype 09: serologic responses. Am. J. Vet. Res. 41: 1607-1610.
- Morgan W.J.B., Mackinnon D.J., Lawson J.R. & Cullen G.A. 1969. The Rose Bengal Plate Agglutination Test in the diagnosis of brucellosis. Vet. Rec. 85: 636-641.
- Nicoletti P. 1967. Utilization of the card test in brucellosis eradication. J. Am. Vet. Med. Assoc. 151: 1778-1783.
- Pilet C.H., Toma B. & André G. 1972. Diagnostic sérologique de la brucellose par l'Épreuve a l'Antigène Tamponné (EAT) ou Card Test. Cah. Méd. Vét. 41: 5-19.