

ISSN 0100-736X

Volume 13 Números 3/4

Jul/Dez 1993

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Brazilian Journal of Veterinary Research



Revista do Colégio Brasileiro de Patologia Animal

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. Os autores devem fazer com que seus trabalhos, quando a ela destinados, sejam datilografados 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, 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)

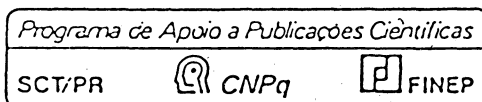
Editor: Jürgen Döbereiner. **Editores Adjuntos:** Severo Sales de Barros, Osmane Hipólito, Jerome Langenegger, Hugo Barboza de Rezende, Adayr Mafuz Saliba, Jefferson Andrade dos Santos, Carlos Hubinger Tokarnia.

Assessoria Científica (Advisory Board)

Carlos Cypriano P. Arteché, 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; Telex 21-32723 EBPA BR; Fax (021) 682-1230.

A revista é editada dentro do



em colaboração com o
Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ

Figura da capa: Bovino com sintomas de “doença da vaca caída” – botulismo. Pela técnica de Microfixação de Complemento, bem mais sensível (40 x) que o Bioensaio em camundongo, conseguiu-se detectar a presença da toxina botulínica tipos C e/ou D em pelo menos um dos materiais coletados de cada um de 23 bovinos que morreram da doença. Com isso, confirmou-se o diagnóstico de botulismo. (Dutra et al., p. 83-86)

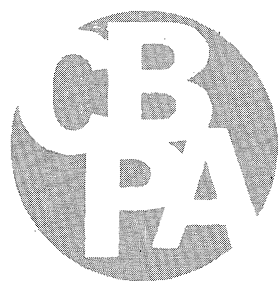
Cover illustration: A cow with clinical signs of botulism (“doença da vaca caída” – fallen cow disease). With the highly sensitive micro-fixation test botulinum type C and/or D toxin was detected in at least one material collected from each of 23 bovines which died of the disease. Thus the diagnosis of botulism could be confirmed. (Dutra et al., p. 83-86)

ISSN 0100-736X

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Brazilian Journal of Veterinary Research

VOLUME 13, 1993



Revista do Colégio Brasileiro de Patologia Animal

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

— uma revista do Colégio Brasileiro de Patologia Animal
A Brazilian Journal of Veterinary Research published by the Brazilian College of Animal Pathology

É revista bilingüe trimestral editada pelo Colégio Brasileiro de Patologia Animal e publica trabalhos originais de pesquisa no campo da patologia animal no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica.

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 welcome. Reviews should be written in support of original investigations. 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, 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)

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

A revista é editada dentro do

Programa de Apoio a Publicações Científicas

SCT/PR



CNPq



FINEP

em colaboração com o
Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

– uma revista do Colégio Brasileiro de Patologia Animal
A Brazilian Journal of Veterinary Research published by the Brazilian College of Animal Pathology

Volume 13

Julho/Dezembro 1993

Números 3/4

SUMÁRIO

Efeito da suplementação com cobre e doenças associadas à carência de cobre em bovinos no Rio Grande do Sul. <i>Riet-Correa F., Bondan E.F., Méndez M.C., Moraes S.S. & Concepción M.R.</i>	45-49
Caracterização de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. <i>Botteon R.M., Dutra I.S., Döbereiner J. & Blobel H.</i>	51-55
Intoxicação experimental em suínos com baixas concentrações de <i>Senna occidentalis</i> (Leg. Caes.) na ração. <i>Rodrigues U., Riet-Correa F., Mores N.</i>	57-66
Intoxicação experimental por <i>Palicourea marcgravii</i> (Rubiaceae) em eqüinos. <i>Tokarnia C.H., Costa E.R., Barbosa J.D., Armién A.G. & Peixoto P.V.</i>	67-72
Botulismo experimental em caprinos pela toxina tipo C. <i>Santos L.B., Mineo J.R., Silva D.A.O., Souza M.A., Coelho H.E., Taketomi E.A., Cardoso A.L.M. & Metidieri M.A.</i>	73-76
Intoxicação experimental por <i>Sisyrinchium platense</i> (Iridaceae) em bovinos. <i>Méndez M.C., Delgado P.E., Santos R., Sechin A. & Riet-Correa F.</i>	77-81
Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. <i>Dutra I.S., Weiss H.-E., Weiss H. & Döbereiner J.</i>	83-86

CONTENTS

Effect of copper supplementation and diseases associated with copper deficiency in cattle in southern Brazil. <i>Riet-Correa F., Bondan E.F., Méndez M.C., Moraes S.S. & Concepción M.R.</i> ...	45-49
Characterization of anaerobic bacteria isolated from periodontal “cara inchada” – lesions of cattle. <i>Botteon R.M., Dutra I.S., Döbereiner J. & Blobel H.</i>	51-55
Experimental intoxication in pigs fed with low concentrations of <i>Senna occidentalis</i> (Leg. Caes.) in the ration. <i>Rodrigues U., Riet-Correa F., Mores N.</i>	57-66
Experimental poisoning of horses by <i>Palicourea marcgravii</i> (Rubiaceae). <i>Tokarnia C.H., Costa E.R., Barbosa J.D., Armién A.G. & Peixoto P.V.</i>	67-72
Experimental type C botulism in goats. <i>Santos L.B., Mineo J.R., Silva D.A.O., Souza M.A., Coelho H.E., Taketomi E.A., Cardoso A.L.M. & Metidieri M.A.</i>	73-76
Experimental intoxication by <i>Sisyrinchium platense</i> (Iridaceae) in cattle. <i>Méndez M.C., Delgado P.E., Santos R., Sechin A. & Riet-Correa F.</i>	77-81
Diagnosis of botulism of cattle in Brazil by micro-complement fixation. <i>Dutra I.S., Weiss H.-E., Weiss H. & Döbereiner J.</i>	83-86

A revista Pesquisa Veterinária Brasileira está incluída em Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences.

This journal is listed in Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences.

Pesquisa veterinária brasileira = Brazilian journal of veterinary
research - v. 1 - n. 1 - 1981 -

Rio de Janeiro : Colégio Brasileiro de Patologia Animal,
1981 -

v. trim. ISSN 0100-736X

1. Pesquisa veterinária - Periódicos - Brasil. I. Colégio
Brasileiro de Patologia Animal, ed. II. Título: Brazilian journal
of veterinary research.

CDD 636.089

CDU 619:616(81)(05)

XIV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, Acapulco, México, maio de 1994

(Informações: Dr. Diódoro Batalla C., Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas de México, Km 15,5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, 05110 México, DF, México; Fax (52-5) 570-0682)

I Congresso Latino Americano de Micotoxicologia, VIII Encontro Nacional de Micotoxinas, Rio de Janeiro, Brasil, 25-29.9.1994

(Informações: Congrex do Brasil, Rua Ouvidor, 60/414, Rio de Janeiro, RJ; Tel. (021) 224-6080; Fax (021) 231-1492)

XXV Congresso Mundial Veterinário, Yokohama, Japão, 3-9.9.1995

(Informações: Secretariat for WVC'95, c/o SANKEI CONVENTION, Sankei Bldg. 10F, 1-7-2, Chiyoda-ku,
Tokyo 100, Japan; Phone +81-3-3273-2084; Fax +81-3-3273-2439)

SUMÁRIO
List of Contents

Vol. 13, Nos. 1/2, Jan./Jun. 1993

Surtos de periodontite em bezerros (“cara inchada”) associados ao manejo do solo. [Outbreaks of periodontitis in calves (“Cara inchada”) related to soil cultivation.] <i>I.S. Dutra, T. Matsumoto & J. Döbereiner</i>	1-4
Intoxicação experimental por <i>Baccharis megapotamica</i> var. <i>megapotamica</i> e var. <i>weirii</i> (Compositae) em ovinos. [Experimental poisoning of sheep by <i>Baccharis megapotamica</i> var. <i>megapotamica</i> e var. <i>weirii</i> (Compositae).] <i>A.G. Armién, P.V. Peixoto & C.H. Tokarnia</i>	5-20
Enzootic calcinosis in sheep. Experimental reproduction with <i>Nierembergia veitchii</i> (Solanaceae). [Calcinose enzootica em ovinos. Reprodução experimental com <i>Nierembergia veitchii</i> (Solanaceae).] <i>F.R. Correa, M.C. Méndez, A.L. Schild & C.A. Petiz</i>	21-24
Intoxicação espontânea por <i>Amaranthus spinosus</i> (Amaranthaceae) em bovinos. [Naturally occurring <i>Amaranthus spinosus</i> (Amaranthaceae) poisoning in cattle.] <i>R.A. Lemos, C.S.L. Barros, M.S. Salles, S.S. Barros & P.V. Peixoto</i>	25-34
Intoxicação experimental por <i>Pseudocalymma elegans</i> (Bignoniaceae) em caprinos. [Experimental poisoning of goats by <i>Pseudocalymma elegans</i> (Bignoniaceae).] <i>C.H. Tokarnia, P.V. Peixoto & J. Döbereiner</i>	35-39
Comparação antigênica de três amostras de vírus da influenza eqüina A/equi 2, isoladas no Brasil. [Antigenic comparison of three strains of equine influenza A/equi 2 virus isolated in Brazil.] <i>R.G. Cunha & M.C.C. Pagano</i>	41-44

Vol. 13, Nos. 3/4, Jul./Dez. 1993

Efeito da suplementação com cobre e doenças associadas à carência de cobre em bovinos no Rio Grande do Sul. [Effect of copper supplementation and diseases associated with copper deficiency in cattle in southern Brazil.] <i>Riet-Correa F., Bondan E.F., Méndez M.C., Moraes S.S. & Concepción M.R.</i>	45-49
Caracterização de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. [Characterization of anaerobic bacteria isolated from periodontal “cara inchada”-lesions of cattle.] <i>Botteon R.M., Dutra I.S., Döbereiner J. & Blobel H.</i>	51-55
Intoxicação experimental em suínos com baixas concentrações de <i>Senna occidentalis</i> (Leg. Caes.) na ração. [Experimental intoxication in pigs fed with low concentrations of <i>Senna occidentalis</i> (Leg. Gaes.) in the ration.] <i>Rodrigues U., Riet-Correa F., Mores N.</i>	57-66
Intoxicação experimental por <i>Palicourea marcgravii</i> (Rubiaceae) em eqüinos. [Experimental poisoning of horses by <i>Palicourea marcgravii</i> (Rubiaceae).] <i>Tokarnia C.H., Costa E.R., Barbosa J.D., Armién A.G. & Peixoto P.V.</i>	67-72
Botulismo experimental em caprinos pela toxina tipo C. [Experimental type C botulism in goats.] <i>Santos L.B., Mineo J.R., Silva D.A.O., Souza M.A., Coelho H.E., Taketomi E.A., Cardoso A.L.M. & Metidieri M.A.</i>	73-76
Intoxicação experimental por <i>Sisyrinchium platense</i> (Iridaceae) em bovinos. [Experimental intoxication by <i>Sisyrinchium platense</i> (Iridaceae) in cattle.] <i>Méndez M.C., Delgado P.E., Santos R., Sechin A. & Riet-Correa F.</i>	77-81
Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. [Diagnosis of botulism of cattle in Brazil by micro-complement fixation.] <i>Dutra I.S., Weiss H.-E., Weiss H. & Döbereiner J.</i>	83-86

ÍNDICE DOS AUTORES

Author Index

- | | | |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Armién A.G. 5, 67 | Döbereiner J. 1, 35, 51, 83 | Rodrigues O. 57 |
| Barbosa J.D. 67 | Dutra I.S. 1, 51, 83 | Salles M.S. 25 |
| Barros C.S.L. 25 | Lemos R.A. 25 | Santos L.B. 73 |
| Barros S.S. 25 | Matsumoto T. 1 | Santos R. 77 |
| Blobel H. 51 | Méndez M.C. 21, 45, 77 | Schild A.L. 21 |
| Bondan E.F. 45 | Metidieri M.A. 73 | Sechin A. 77 |
| Botteon R.M. 51 | Mineo J.R. 73 | Silva D.A.O. 73 |
| Cardoso A.L.M. 73 | Moraes S.S. 45 | Souza M.A. 73 |
| Coelho H.E. 73 | Mores N. 57 | Taketomi E.A. 73 |
| Concepción M.R. 45 | Pagano M.C.C. 41 | Tokarnia C.H. 5, 35, 67 |
| Costa E.R. 67 | Peixoto P.V. 5, 25, 35, 67 | Weiss H. 83 |
| Cunha R.G. 41 | Petiz C.A. 21 | Weiss H.-E 83 |
| Delgado P.E. 77 | Riet-Correa F. 21, 45, 57, 77 | |

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos, em original e *uma* cópia, escritos em português ou inglês, devem ser enviados ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Colégio Brasileiro de Patologia Animal, 23851 Seropédica, Rio de Janeiro. Devem constituir-se de resultados ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Apesar de não serem aceitas comunicações ("Short communications") sob forma de "Notas Prévias", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve porém conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Corpo Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em TÍTULO, ABSTRACT, SINOPSE, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinações destes três últimos), AGRADECIMENTOS e REFERÊNCIAS:

a) o *Título* do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;

b) *Abstract*, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos "index terms";

c) a *Sinopse* deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, Sinopse e Abstract trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último número da revista);

d) a *Introdução* deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

e) em *Material e Métodos* devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;

f) em *Resultados* deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

g) na *Discussão* os resultados devem ser discutidos diante da literatura; não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

h) as *Conclusões* devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

i) *Agradecimentos* devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

j) a lista de *Referências*, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as instruções de "Normalização da Documentação no Brasil" (IBICT-ABNT), "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences) e/ou "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:

a) os trabalhos devem ser datilografados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corriadamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os

sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes; Sinopse e Abstract serão escritos corriadamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final da respectiva referência, na forma: "(Citado por Fulano 19..)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último número da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As *figuras* (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos ("slides") coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão datilografadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os quadros deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, começando de *a* em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço de 12 batidas, à esquerda.

6. Aos autores de cada trabalho publicado serão fornecidas 50 separatas.

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM COBRE E DOENÇAS ASSOCIADAS À CARÊNCIA DE COBRE EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL¹

FRANKLIN RIET-CORREA^{2,3}, EDUARDO F. BONDAN⁴, MARIA C. MÉNDEZ^{2,3}, SHEILA S. MORAES⁵ e MIGUEL R. CONCEPCIÓN⁶

ABSTRACT.- Riet-Correa F., Bondan E.F., Méndez M.C., Moraes S.S. & Concepción M.R. 1993. [Effect of copper supplementation and diseases associated with copper deficiency in cattle in southern Brazil.] Efeito da suplementação com cobre e doenças associadas à carência de cobre em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(3/4):45-49. Laboratório Regional de Diagnóstico, Fac. Veterinária, UFPel, 96100-000 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Two trials were performed to recognize copper deficiency in cattle in the coastal region of Rio Grande do Sul. Heifers and steers were injected, at 3 months intervals, with a preparation containing 100mg of copper. In one farm, 6 months after the start of the trial, the weight gains (85.1 kg) of 67 heifers supplemented were significantly higher ($p < 0.05$) than the weight gains (80.28 kg) of 68 non supplemented heifers. In another farm in a trial with 2 groups of 57 steers each, there were no significant weight gain differences between the supplemented and the control group 18 months after the start of the trial. These results suggest a marginal copper deficiency in cattle in the area. In the same region, 5 outbreaks of sudden deaths were studied. The mean copper concentration in the livers in 11 cattle that died suddenly was 4.2 ppm - dry basis (d.b.), varying from 1.3 to 8.4 ppm - d.b. These low concentrations indicate that the disease may be associated with a copper deficiency. A disease of calves characterized by flacid paralysis or progressive ataxia at birth was also studied. A myelin deficiency in the spinal cord white matter was observed histologically. Affected calves had low copper concentrations in the liver (7.6 ppm - d.b.) and spinal cord (6.9 and 7.4 ppm - d.b.). The similarity of this congenital hypomyelination with other diseases of the nervous system caused by copper deficiency in cattle and sheep and the low copper concentrations in tissues, suggest that the disease is caused by a copper deficiency.

INDEX TERMS: Copper deficiency, copper supplementation, cattle, sudden death, congenital hypomyelination, enzootic ataxia.

SINOPSE.- Dois experimentos foram realizados para estabelecer a ocorrência da deficiência de cobre em bovinos no Litoral do Rio Grande do Sul. Novilhos e novilhas foram suplementados por via parenteral, a cada 3 meses, com uma emulsão contendo 100 mg de cobre. Em um estabelecimento, 6 meses após o início do experimento, o ganho de peso (85,1 kg) de 67 novilhas suplementadas foi significativamente superior ($P < 0,05$) ao ganho de peso (80,28 kg) de 68 novilhas que permaneceram como controle. Em outro estabelecimento, em um experimento com 2 grupos de 57 novilhos, não houve diferenças significativas entre o grupo suplementado e o grupo controle, após 18 meses de iniciada a suplementação. Esses resultados permitem concluir que ocorre carência de cobre em algumas áreas do Estado, e que a resposta

à suplementação é variável. Foram estudados 5 surtos de mortes súbitas em bovinos, ocorridos em estabelecimentos localizados às margens da Lagoa dos Patos ou da Lagoa Mirim. Os níveis de cobre hepáticos em 11 animais mortos subitamente variaram de 1,3 a 8,4 ppm - base seca (b.s.), com uma média de 4,2 ppm - b.s. Esses resultados indicam a possibilidade de que a deficiência de cobre esteja envolvida na etiologia da enfermidade. Também foi estudada, na mesma região, uma doença dos bovinos caracterizada pelo nascimento de bezerras com paralisia flácida ou ataxia progressiva. Histologicamente foi observada deficiência de mielina na substância branca da medula espinhal. Níveis baixos de cobre foram encontrados no fígado (7,6 ppm - b.s.) e medula (6,9 e 7,4 ppm - b.s.) de 2 bovinos afetados. A semelhança desta hipomielinogênese congênita com outras enfermidades do sistema nervoso causadas por deficiência de cobre em ovinos e bovinos e os baixos níveis de cobre encontrados nos tecidos sugerem que a doença é causada por uma deficiência desse microelemento.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Deficiência de cobre, suplementação com cobre, bovinos, mortes súbitas, hipomielinogênese congênita, ataxia enzootica.

INTRODUÇÃO

A carência de cobre causa diversos quadros clínicos em bovinos, incluindo anemia, osteoporose, hipomielinogê-

¹ Aceito para publicação em 5 de novembro de 1992.

Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

² Laboratório Regional de Diagnóstico, Fac. Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS 96100-000.

³ Bolsista do CNPq.

⁴ Curso de Pós-Graduação em Veterinária, Fac. Veterinária, UFPel, Pelotas, RS 96100-000.

⁵ Centro Nacional de Pesquisas de Gado de Corte (Embrapa), Caixa Postal 154, Campo Grande, MS 97100-000.

⁶ Leivas Leite, Indústrias Químicas e Biológicas, Rua Benjamin Constant 1637, Pelotas, RS 96100-000.

nese congênita, alterações da pigmentação dos pêlos, diarreia e morte súbita (Underwood 1977, Sanders 1980, Valli 1985). Ocorrem também perdas subclínicas devidas a menor desenvolvimento corporal e baixo desempenho reprodutivo, traduzido em baixas percentagens de prenhez e parição (Underwood 1977, Hidiogrou 1979).

No Brasil, a carência de Cu causa ataxia enzoótica em ovinos no Piauí (Tokarnia et al. 1966), e nos Estados do Piauí, Maranhão e Rio de Janeiro tem sido indentificada como possivelmente envolvida na etiologia de uma doença dos bovinos conhecida como "ronca", "mal da ronqueira" ou "mal do roncado", caracterizada por respiração ruidosa e emagrecimento progressivo até a morte (Tokarnia et al. 1968, 1971). Níveis deficientes de Cu em fígados de bovinos e/ou em amostras de pastagens e solo têm sido detectados em diversos Estados, incluindo Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e Amazonas (Tokarnia & Döbereiner 1973, Tokarnia et al. 1988).

Recentemente, Bondan et al. (1991) determinaram os níveis de Cu em 226 amostras de fígados de bovinos, provenientes da região sul do Rio Grande do Sul, encontrando que 32,6% das amostras apresentavam níveis deficientes (inferiores a 25 ppm - b.s.). O presente trabalho tem como objetivos determinar a ocorrência da carência de Cu através da resposta à suplementação em bovinos e descrever os quadros clínicos associados a níveis hepáticos muito baixos de Cu.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimentos de suplementação com cobre

Experimento 1. Um rebanho de 135 novilhas, de aproximadamente 1 ano de idade, cruzas da raça Shorthorn, foi dividido em 2 grupos de peso similar. Um dos grupos, de 68 animais, foi escolhido ao acaso como controle, e o outro, de 67 animais, foi suplementado com Cu. A suplementação realizou-se mediante a inoculação subcutânea de 4 ml de uma emulsão, de liberação prolongada, que continha 25 mg de Cu/ml (Glypondin®). Os animais foram pesados individualmente em 27.10.87, 27.01.88 e 27.04.88. Nas duas primeiras datas foi realizada a inoculação de Cu nos animais do grupo tratado. Durante o experimento, os 2 grupos permaneceram juntos em um potreiro localizado na beira da Lagoa Mirim, no Município de Rio Grande, em um estabelecimento onde, segundo informação do proprietário, tinham ocorrido mortes súbitas em bovinos no ano anterior.

Experimento 2. Foi realizado em um rebanho de 114 novilhas, cruzas das raças Charolês, Hereford, Holandês e Nelore, que

foram divididos em 2 grupos, de peso similar, de 57 animais cada um. Nos dias 18.12.87, 18.03.88, 28.06.88, 28.09.88, 18.01.89 e 05.06.89, os animais foram pesados individualmente. Nas 5 primeiras datas os novilhas do grupo tratado foram suplementados com Cu, da mesma forma que no Experimento 1. Durante o experimento, os 114 animais permaneceram juntos em potreiros de um estabelecimento do Município de Arroio Grande, onde no ano anterior tinha ocorrido um surto de mortes súbitas.

Estudo de doenças associadas à carência de Cu

Mortes súbitas em bovinos. Cinco surtos desta doença foram estudados no período de 1986 a 1990. Os sinais clínicos foram descritos pelos produtores que observaram a enfermidade. Somente em um surto (nº 3) foram realizadas necropsias pelos autores. Nos demais surtos, diversos órgãos foram enviados ao Laboratório Regional de Diagnóstico (L.R.D.) pelos veterinários que realizaram as necropsias. Esses materiais incluíram fígado, rim, coração (em todos os surtos), pulmão (nos surtos 1 e 5), sistema nervoso central, baço, rúmen e intestino (no surto 1). Em todos os casos, material de fígado foi semeado em ágar-sangue e ágar-MacConkey para estudo bacteriológico, e amostras dos órgãos enviados eram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados a 6 micra e corados pela técnica de hematoxilina-eosina. Os níveis de Cu hepático de 11 animais e os níveis de Fe, Zn e Mn de 2, foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica.

Hipomielinogênese congênita. Foram estudados 2 surtos desta doença. Um animal de cada surto foi enviado ao L.R.D. para observação dos sinais clínicos e posterior sacrifício e necropsia. Nos animais necropsiados, amostras dos órgãos das cavidades abdominal e torácica, e a totalidade do sistema nervoso central (SNC) foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados a 6 micra e corados pela técnica de hematoxilina-eosina. Os cortes do SNC, realizados transversalmente à altura do córtex cerebral, gânglios da base, tálamo, tubérculos quadrigêmeos, cerebelo, ponte e medulas oblonga, cervical, torácica e lombar, foram também corados pela técnica de azul rápido de luxol para mielina. Encéfalo e medula de um bezerro da mesma idade que os afetados foram utilizados como controle para a interpretação das lesões histológicas. Os níveis de Cu do fígado de um animal e os níveis de Cu do SNC dos 2 animais foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica.

RESULTADOS

Suplementação com cobre

O peso inicial e ganhos de peso nos grupos suplementados e nos grupos controle dos 2 experimentos são apresentados nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1. Peso inicial e ganho de peso em novilhas suplementadas e não suplementadas com Cu, no Experimento 1

Grupo	Peso inicial	Ganhos de peso (kg)		
		De 27.10.87 a 27.01.88	De 27.01.88 a 27.04.88	De 27.10.87 a 27.04.88
Suplementado	159,087 ± 24,990 n = 68	42,24 ± 8,61 ^{a*}	43,09 ± 11,21 ^a	85,81 ± 14,8 ^a
Não suplementado	159,860 ± 24,48 n = 67	39,07 ± 7,84 ^a	40,92 ± 10,13 ^a	80,62 ± 13,28 ^b

* Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (P < 0.05).

Quadro 2. *Peso inicial e ganho de peso em novilhas suplementadas e não suplementadas com Cu, no Experimento 2*

Grupo	Peso inicial (kg) X ± s	Ganhos de peso (kg)					
		De 18.12.87 a 18.03.88	De 18.03.88 a 28.06.88	De 28.06.88 a 28.09.88	De 28.09.88 a 18.01.89	De 18.01.89 a 05.06.89	De 18.12.87 a 05.06.89
Suplementado ^a	180,94 ± 35,40	73,19 ± 14,21	0,526 ± 10,02	- 23,89 ± 12,1	23,30 ± 13,19	65,36 ± 17,00	138,52 ± 26,08
Não suplementado	181,38 ± 37,38	70,11 ± 13,38	0,836 ± 10,38	- 25,85 ± 14,8	27,94 ± 10,01	66,36 ± 24,33	139,40 ± 39,08

^a Não houve diferença estatisticamente significativa a nível de P < 0,05 entre os grupos suplementado e não suplementado em nenhuma das pesagens.

Mortes súbitas

Cinco surtos desta doença foram estudados entre os anos 1986 e 1990. Em todos os casos, as mortes ocorreram quando o rebanho era movimentado, observando-se durante o transporte que alguns animais, aparentemente normais, caíam subitamente, apresentando tremores musculares e morrendo após alguns minutos.

Os municípios onde ocorreram os surtos, a data, o tipo de animal afetado, idade e sexo, e a mortalidade constam do Quadro 3. O surto 4 ocorreu em uma resteva onde tinha sido colhido arroz no mês de março do mesmo ano; os surtos 1, 2, 3 e 5 ocorreram em poteiros que tinham sido utilizados para plantar arroz em anos anteriores. Somente na fazenda onde ocorreu o surto 1, havia uma pequena área de mata nativa no poteiro, não sendo obser-

Quadro 3. *Localização, data de ocorrência, rebanhos afetados e mortalidade em 5 surtos de morte súbita em bovinos*

Nº surto	Município	Data do surto	Rebanho afetado	Idade	Mortalidade Nº (%)
1	Tapes	07.86	180 novilhas	3 anos	4 (2,2%)
2	Arroio Grande	06.87	1.000 bovinos	Diversas	10 ^a (1%)
3	Rio Grande	06.87	100 novilhas e novilhas	2-3 anos	9 (9%)
4	São Lourenço	08.89	120 vacas e 80 bezerros	> 4 anos e 10-12 meses	7 (5,8%) e 1 (1,25%)
5	Rio Grande	10.90	70 novilhas e novilhas	1-2 anos	20 (28,6%)

^a Morreram 2 novilhas de 1 ano, 2 vacas adultas e 6 novilhas de 2 a 3 anos.

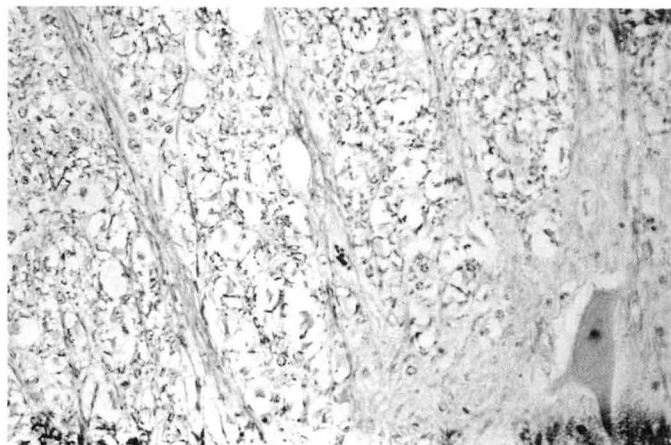


Fig. 1. *Severa deficiência de mielina da medula cervical quando comparado com o controle da Fig. 2. Bezerro 6. Azul rápido de luxol, obj. 25.*

Quadro 4. *Níveis hepáticos de Cu, Fe, Mn e Zn em bovinos com morte súbita*

Surto	Nº fígados examinados	Níveis (ppm - base seca)			
		Cu	Fe	Mn	Zn
1	1	3,5	ND ^a	ND	ND
2	3	4,2 ^b ;3,7;3,7			
3	5	2,6;1,3;1,8;7,3;3,0	ND	ND	ND
4	1	8,4	109,4	20	132,2
5	1	6,8	418,3	13,8	125

^a ND = não determinado.

^b Cada valor corresponde a um animal.

vada, porém, nenhuma planta tóxica descrita como causante de mortes súbitas em bovinos. Em um estabelecimento vizinho ao estabelecimento onde ocorreu o surto 3, teriam morrido, no mesmo ano, 40 bovinos com sinais clínicos similares. No estabelecimento onde ocorreu o surto 4, tinham morrido no ano anterior, subitamente, 1 novilha e 4 vacas. Os estabelecimentos estavam localizados na beira da Lagoa Mirim (surtos 2, 3 e 5) ou Lagoa dos Patos (surtos 1 e 4).

Nas necropsias realizadas, no surto 3, as carcaças estavam em avançado estado de autólise; nos exames histológicos, inclusive de materiais enviados, não foram observadas lesões de significação. Nas culturas realizadas não foram isoladas bactérias de significação patológica. Os níveis hepáticos de Cu, Fe, Mn e Zn são apresentados no Quadro 4.

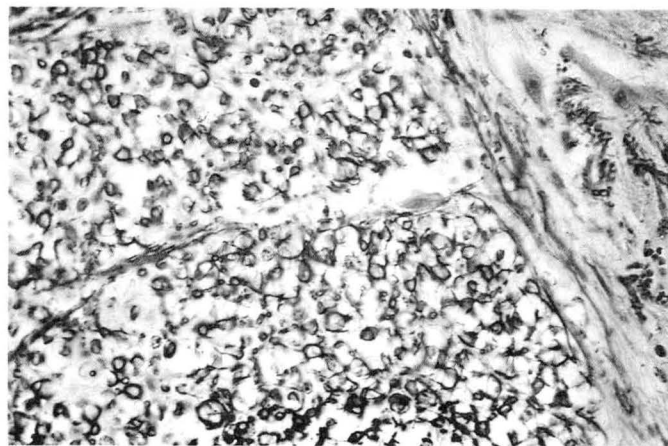


Fig. 2. *Medula cervical do bezerro controle. Azul rápido de luxol, obj. 25.*

Quadro 5. Níveis de Cu no sistema nervoso central e fígado em 2 casos de hipomielinogênese congênita

Caso	Níveis de cobre (ppm – base seca)			
	Cérebro	Cerebelo	Medula	Fígado
6	7,64	7,29	6,94	7,64
7	13,32	14,81	7,40	ND ^a

^a ND = não determinado.

Hipomielinogênese congênita

Um caso desta doença foi observado no município de Arroio Grande em um rebanho de animais da raça Charolês e cruzas. De 5 bezerros nascidos no mês de novembro, 1 apresentou ataxia progressiva. Aos 30 dias após o nascimento, quando foi enviado ao L.R.D. para ser sacrificado, não podia permanecer em pé e apresentava opistótono. Outro surto foi observado no Município de Santa Vitória do Palmar, em um rebanho de diversas raças e cruzas. De um total de 60 bezerros nascidos, filhos de 3 touros diferentes, 8 apresentaram ao nascimento incapacidade para se manter em pé, observando-se opistótono e extensão dos membros anteriores e posteriores. Um desses animais foi alimentado artificialmente pelo proprietário durante 30 dias, permanecendo inalterados os sinais clínicos; após esse período foi sacrificado.

Nas necropsias de um animal com ataxia progressiva no primeiro estabelecimento (Caso nº 6), e de um animal recém-nascido, com paralisia, no outro estabelecimento (Caso nº 7), não foram observadas lesões macroscópicas. No estudo histológico foi constatada uma severa deficiência de mielina na substância branca da medula cervical (Fig. 1), dorsal e lombar, afetando principalmente os fascículos ventrais. O animal-controle apresentava quantidades normais de mielina (Fig. 2). Na medula oblonga observou-se também um discreto grau de hipomielinogênese. O caso nº 7 apresentava uma deficiência de mielina menos marcada que o anterior, sendo mais evidente no fascículo ventral da substância branca da medula oblonga e medula cervical. Os níveis de Cu do sistema nervoso central nos casos nºs 6 e 7 e do fígado no caso nº 6 são apresentados no Quadro 5.

DISCUSSÃO

Em um trabalho anterior foi determinado que no sul do Rio Grande do Sul há depleção dos níveis hepáticos de Cu em bovinos, encontrando-se em 32,6%, de um total de 365 fígados examinados, níveis inferiores a 25 ppm (b.s.), considerados deficientes (Bondan et al. 1991). O experimento de suplementação com Cu realizado em dois estabelecimentos evidenciou um aumento significativo no ganho de peso dos animais suplementados em um estabelecimento (Quadro 1), enquanto que no outro não houve diferenças significativas entre os animais suplementados e aqueles não suplementados (Quadro 2). Para Clark et al. (1985) existe uma relação entre a resposta produtiva e o grau de carência de um mineral. Quando os níveis de mineral são invariavelmente baixos, a resposta sempre

ocorre; quando os níveis são marginais, a resposta pode ocorrer ou não, e quando os níveis são adequados, a resposta nunca ocorre. Segundo esses conceitos, podemos definir que nas regiões do Litoral e Encosta do Sudeste do Rio Grande do Sul, onde foram realizados os experimentos e onde se registram os menores níveis hepáticos de cobre em bovinos do sul do Estado (Bondan et al. 1991), ocorre carência de cobre e que essa carência é marginal, podendo ou não evidenciar-se por uma resposta clínica à suplementação.

Das diversas formas clínicas observadas na carência de cobre, mencionadas na introdução, duas pareceriam ocorrer no Rio Grande do Sul: mortes súbitas em bovinos de diversas idades e ataxia neonatal em bezerros. As mortes súbitas descritas neste trabalho são muito similares às observadas na doença conhecida na Austrália como "falling disease", considerada como uma manifestação terminal da carência de Cu (Bennets et al. 1948). Nessa doença encontram-se níveis hepáticos muito baixos de Cu, entre 1 e 6 ppm – b.s. (Bennets et al. 1939, 1942, 1948), similares aos encontrados neste trabalho nos casos de morte súbita. Na doença conhecida como "falling disease", o coração apresenta-se de coloração mais pálida do que o normal e flácido, com lesões histológicas de atrofia do miocárdio e substituição por tecido fibroso (Bennets et al. 1948). Nos casos estudados no Rio Grande do Sul, esses exames ficaram prejudicados. Leight (1975), em animais com deficiência experimental de Cu, observou hipertrofia cardíaca, evidenciada quando o peso do coração era expressado como uma proporção do peso corporal, e, apesar de não se observar sinais clínicos nem lesões macroscópicas ou histológicas, o estudo da microscopia eletrônica mostrou lesões morfológicas extensas nas miofibrilas, principalmente nos mitocôndrias, devidas provavelmente a uma diminuição de citocromo oxidase, enzima que depende da presença de Cu para o seu funcionamento.

No Brasil, as únicas doenças descritas como causa de mortes súbitas em bovinos são causadas por plantas tóxicas, descrevendo-se quatro espécies do gênero *Palicourea*, duas do gênero *Arrabidaea*, quatro do gênero *Mascagnia*, e *Pseudocalymma elegans* como causantes deste tipo de mortes. Adicionalmente, espécies da África do Sul (*Dichapetalum* spp.) e da Austrália (*Gastrolobium* e *Oxylobium* spp.) também causam morte súbita (Tokarnia et al. 1990). Essas intoxicações não têm sido diagnosticadas no Rio Grande do Sul e nenhuma dessas plantas foi encontrada nos poteiros onde ocorreram os surtos de mortes súbitas descritas neste trabalho. Em todos os estabelecimentos, a doença ocorreu em áreas que tinham sido utilizadas em períodos anteriores para plantar arroz, sendo que somente em um estabelecimento havia uma pequena área de mata nativa.

A hipomielinogênese congênita, observada em bezerros em 2 estabelecimentos, apresentou um quadro clínico e patológico semelhante à ataxia neonatal descrita por Sanders (1980) em bezerros nascidos de vacas com baixos níveis de Cu, sendo também semelhante à ataxia en-

zoótica dos ovinos, causada pela deficiência de cobre e que tem sido descrita em diversas regiões do mundo (Valli 1985), incluindo o Brasil (Tokarnia et al. 1966). Nessa doença, a deficiência de Cu leva a uma deficiência de citocromo-oxidase, enzima que participa na síntese de fosfolípidios, componentes fundamentais da mielina (Underwood 1977).

O diagnóstico de que a hipomielinogênese congênita descrita neste trabalho é causada por uma deficiência de Cu, baseia-se nas alterações histológicas caracterizadas por uma marcada deficiência de mielina, e nos níveis hepáticos muito baixos de Cu (7,64 ppm – b.s.) encontrados no único bezerro afetado em que foi determinado o valor do mineral no fígado. Os níveis hepáticos de Cu em bovinos são maiores no feto e no recém-nascido do que nos animais adultos. Cunningham (1946) encontrou valores de Cu de 143 a 655 ppm – b.s., com uma média de 381 ppm – b.s., em fígados de 41 bezerras recém-nascidos normais, e níveis de 8 a 109 ppm – b.s., com uma média de 55 ppm – b.s., em fígados de bezerras com deficiência de Cu. Também foram encontrados níveis baixos de Cu no córtex cerebral, cerebelo e medula no caso nº 6, e na medula no caso nº 7. Bovinos com carência de Cu apresentam concentrações inferiores a 9 ppm – b.s. no sistema nervoso central, enquanto que em bovinos sadios a concentração média é de 18 ppm – b.s. (Merz & Davis 1986).

Todos os surtos de morte súbita e de ataxia neonatal, assim como a resposta positiva à suplementação com Cu, foram constatados em estabelecimentos localizados nas margens da Lagoa Mirim ou da Lagoa dos Patos, nas regiões do Rio Grande do Sul denominadas como Litoral e Encosta do Sudeste, nas quais Bondan et al. (1991) encontraram níveis hepáticos de Cu significativamente menores do que em outras regiões do sul do Estado. Trata-se de áreas de solos arenosos, de planícies costeiras e lacustres, muito semelhantes às descritas em outras regiões do mundo onde a carência de Cu é frequente (Blood & Radostits 1989).

Os resultados obtidos por Bondan et al. (1991) e os apresentados neste trabalho permitem estabelecer a ocorrência da carência de Cu nessas áreas do Rio Grande do Sul, já que foram cumpridas as seguintes premissas: 1) observação de sinais clínicos e patologia, associados à deficiência do microelemento; 2) níveis baixos de Cu nos tecidos dos animais, e 3) resposta positiva à suplementação. Essa carência de Cu parece ser primária já que trabalhos realizados em forrageiras no Rio Grande do Sul demonstraram níveis baixos de Cu em algumas ocasiões (Gavillon & Quadros 1970, Trindade et al. 1990), enquanto que os níveis de molibdênio eram normais ou menores dos que os normais (Gavillon & Quadros 1970), e

os níveis de enxofre eram frequentemente inferiores aos normais (Trindade et al. 1990).

REFERÊNCIAS

- Bennets H.W. & Hall H.T.B. 1939. "Falling disease" of cattle in the South West of Western Australia. *Aust. Vet. J.* 15:152-159.
- Bennets H.W., Beck A.B., Harley R. & Evans S.T. 1941. "Falling disease" of cattle in the South-West of Western Australia. 2. Studies of copper deficiency in cattle. *Aust. Vet. J.* 17:85-93.
- Bennets H.W., Harley R. & Evans S.T. 1942. Studies on copper deficiency of cattle: The fatal termination ("falling disease"). *Aust. Vet. J.* 18:50-63.
- Bennets H.W., Beck A.B. & Harley R. 1948. The pathogenesis of "falling disease". *Aust. Vet. J.* 24:237-244.
- Blood D.C. & Radostits O.M. 1989. *Veterinary Medicine*. 7th ed. Ballière Tindall, London, p. 1160-1174.
- Bondan E., Riet-Correa F. & Giesta S. 1991. Níveis hepáticos de cobre em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 11:75-80.
- Clark R.G., Wright D.F. & Millar R.R. 1985. A proposed new approach and protocol to defining mineral deficiencies using reference curves. Cobalt deficiency in young sheep is used as a model. *N.Z. Vet. J.* 33:1-5.
- Cunningham I.J. 1946. Copper deficiency in cattle and sheep on peat lands. *N.Z. J. Sci. Tech., Sec. A*, 27:381-396.
- Gavillon O. & Quadros A.T. 1970. Levantamento da composição mineral das pastagens nativas no Rio Grande do Sul. Departamento de Produção Animal, Secretaria da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 1-8.
- Hidroglou M. 1979. Trace element deficiencies and fertility in ruminantes: a review. *J. Dairy Sci.* 62:1195-11206.
- Leigh L.H. 1975. Changes in the ultrastructure of cardiac muscle in steers deprived of copper. *Res. Vet. Sci.* 18:282-287.
- Merz W. & Davis G.K. 1986. Cooper, p. 301-350. In: Merz W. (ed.) *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Vol. I. Academic Press, London.
- Sanders D.E. 1980. Bovine neonatal ataxia associated with hypocupremia in pregnant cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176:728-729.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J., Canella C.F.C. & Guimarães J. A. 1966. Ataxia enzoótica em cordeiros no Piauí. *Pesq. Agropec. Bras.* 1:375-382.
- Tokarnia C.H., Canella C.F.C., Guimarães J.A. & Döbereiner J. 1968. Deficiências de cobre e cobalto em bovinos e ovinos no Nordeste e Norte do Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 3:351-360.
- Tokarnia C.H., Guimarães J.A., Canella C.F.C. & Döbereiner J. 1971. Deficiências de cobre e cobalto em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 6:61-77.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1973. Diseases caused by mineral deficiencies in cattle raised under range conditions in Brazil, a review. *Pesq. Agropec. Bras.* 8 (Supl.):1-6.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Moraes S.S. 1988. Situação mineral e perspectivas de investigação sobre nutrição mineral em bovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 8:1-16.
- Tokarnia C.H., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 1990. Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 10(1/2):1-10.
- Trindade D.S., Cavalheiro A.C.L. & Arnt L.M. 1990. Concentrações de cobre, zinco e enxofre em pastagens do Rio Grande do Sul. *Revta Soc. Bras. Zootec.* 19:489-497.
- Underwood E.J. 1977. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. 4th ed. Academic Press, New York, 545 p.
- Valli V.E.O. The hematopoietic system, p. 125-130. In: Jubb K.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed) *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 3. 3rd ed. Academic Press, New York.

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ISOLADAS DE LESÕES PERIDENTÁRIAS DA "CARA INCHADA" DOS BOVINOS¹

RITA M. BOTTEON², IVERALDO S. DUTRA³, JÜRGEN DÖBEREINER⁴ e HANS BLOBEL⁵

ABSTRACT.- Botteon R.M., Dutra I.S., Döbereiner J. & Blobel H. 1993. [Characterization of anaerobic bacteria isolated from periodontal "cara inchada"-lesions of cattle.] Caracterização de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(3/4):51-55. Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970, Brazil.

Anaerobic, non-sporulating, Gram negative bacteria were isolated from periodontal "cara inchada"-lesions and characterized. The capacity of fermentation and hydrolysis of different substrates by 52 isolates was studied by means of the API 20 A - System. Fifteen isolates which formed black pigmented or brown non-fermenting colonies, were classified as *Bacteroides asaccharolyticus* according to their growth pattern in CDC culture medium and their morphologic staining properties, as well as to their biochemical and physiologic profile. Twenty-three isolates which showed the same colonial characteristics, but were non-fermentative, were classified as *Bacteroides* spp. Based on these results, 8 other cultures were indentified as non-pigmented *Bacteroides* spp. and 6 isolates as *Fusobacterium nucleatum*. In addition, 68 strains of the 4 groups of bacteria isolated were studied regarding their growth in BGA (*Bacteroides gingivalis* agar) and the formation of a fluorescent pigment. No correlation between the growth on BGA and the fluorescence of the brown or black-pigmented cultures was found. Furthermore, although the API 20 A - System allowed an extensive characterization of the isolates, it could not be sufficient for definite taxonomic purposes.

INDEX TERMS: Periodontitis, "cara inchada", bovines, anaerobic bacteria, *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides* spp., *Fusobacterium nucleatum*.

SINOPSE.- Foram caracterizadas amostras de bactérias anaeróbias não esporuladas Gram negativas isoladas de quatro bezerros com periodontite ("cara inchada"). A capacidade de fermentação ou hidrólise de diferentes substâncias de 52 amostras foi verificada pelo Sistema API 20 A. De acordo com o crescimento em meio de cultivo CDC, das características morfotintórias e do perfil bioquímico e fisiológico, 15 amostras formadoras de colônias pigmentadas de negro ou marrom não fermentativas foram classificadas como *Bacteroides asaccharolyticus* e 23, com as mesmas características das colônias, no entanto fermentativas, como *Bacteroides* spp. Com base nos resultados, foram ainda caracterizadas 8 amostras como *Bacteroides* spp, não pigmentadas e 6 como *Fusobacterium nucleatum*. Adicionalmente, outras 68 amostras de bactérias pertencentes aos 4 grupos isolados, foram

estudadas quanto à capacidade de crescimento em meio de cultura seletivo BGA (*Bacteroides gingivalis* agar) e de formação de pigmento fluorescente, perfazendo-se assim 120 amostras. Não foram observadas correlações entre o crescimento em BGA e a fluorescência das amostras pigmentadas de marrom ou negro. Além disso, ainda que o Sistema API 20 A tenha permitido uma caracterização extensa das amostras isoladas, este não podia ser eficaz para fins taxonômicos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Periodontite, "cara inchada", bovinos, bactérias anaeróbias, *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides* spp., *Fusobacterium nucleatum*.

INTRODUÇÃO

A "cara inchada" dos bovinos (CI) é uma periodontite que acomete animais na idade de erupção dos dentes, quando mantidos em determinadas áreas de pastagem. A doença está relacionada com a formação de pastos em solos virgens (Döbereiner et al. 1990) e com a renovação dos mesmos (Dutra et al. 1993). Nos primeiros anos de ocorrência a doença pode incidir em grande número de animais, tendendo a diminuir naturalmente com o decorrer dos anos. Clinicamente a doença caracteriza-se por alterações peridentárias geralmente com início entre o se-

¹ Aceito para publicação em 8 de dezembro de 1992.

Este trabalho é parte da tese de Mestrado do primeiro autor, jul 6 à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

² Pós-graduação em Microbiologia Veterinária, UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970.

³ Depto Medicina Veterinária, Unesp-Campus de Araçatuba, São Paulo, R. José Bonifácio 1193, Araçatuba, SP 16015-050; bolsista CNPq (305967/85-1).

⁴ Proj. Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970; bolsista CNPq (305294/88-1).

⁵ Institut f. Bakteriologie u. Immunologie, Justus Liebig-Universität, Frankfurter Str. 107, D-6300 Giessen, República Federal da Alemanha.

gundo e o terceiro dentes premolares decíduos maxilares, com formação de pequenas bolsas na gengiva marginal, resultando em periodontite purulenta. Casos avançados caracterizam-se por mau estado nutricional, ocorrendo freqüentemente a morte por inanição (Döbereiner et al. 1974).

A presença de microrganismos anaeróbios não esporulados nas lesões peridentárias da doença (Blobel et al. 1984), a constatação de que os mesmos produzem substâncias com potencial para destruição tissular (Dutra et al. 1986), e os aspectos patológicos e epidemiológicos da CI indicam o envolvimento primário de bactérias no processo (Döbereiner 1990). Assim, este trabalho objetiva a caracterização de microrganismos anaeróbios isolados de lesões peridentárias da CI, considerando-se os seus aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados no experimento

Foram utilizados 4 bezerros mestiços nelore e guzerá de 3 meses a 1 ano de idade, provenientes de áreas com elevada prevalência de CI (São Simão e Campos Novos Paulista, SP), e transferidos para o biotério da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Núcleo de Pesquisa em Saúde Animal, Seropédica, RJ. Os animais foram identificados por brincos de números 0039, 0052, 0065 e 0092.

Obtenção das amostras

Com auxílio de um abre-bocas, e utilizando-se de cureta odontológica estéril, o material foi obtido diretamente da bolsa peridentária entre os segundos e terceiros pré-molares decíduos (Pd e Pd₂) maxilares. O material colhido foi imediatamente acondicionado em frasco estéril, contendo 1 ml de solução de Ringer lactato pré-reduzida, e o plaqueamento realizado dentro de um período máximo de 1 hora, seguindo-se recomendação de Loesche (1969).

A partir do material originalmente colhido foram realizadas sucessivas diluições em solução de Ringer lactato pré-reduzida. Com auxílio de uma alça de Drigalsky, 2 gotas das diluições foram uniformemente espalhadas sobre a superfície dos meios de cultura CDC (Central for Disease Control), enriquecido com hemina (5 µg/ml), vitamina K1 (0,5 mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro, conforme descrito por Blobel et al. (1984) e agar sangue (AS). De cada diluição foram realizados plaqueamentos pareados. A incubação em anaerobiose foi pelo Sistema Gaspack⁶ a 37°C por 5 a 7 dias. As colônias morfológicamente diferentes e mais freqüentes na cultura original foram agrupadas em categorias considerando-se a pigmentação, forma, aspecto dos bordos e elevação. Para obtenção de culturas puras as mesmas foram repicadas em CDC. Após esta etapa foram selecionadas apenas amostras anaeróbias estritas, certificadas pelo plaqueamento das mesmas em AS e CDC e incubação em aerobiose e microaerofilia.

Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica das amostras

Foram observados os critérios estabelecidos por Holdeman et al. (1977), como as propriedades morfológicas pelo método de

Gram, tempo de crescimento em anaerobiose, pigmentação das colônias após 7 e 14 dias de incubação a 37°C e catalase. A caracterização bioquímica das amostras foi realizada através do sistema API 20 A⁷, constando as reações de fermentação ou hidrólise de glicose, maltose, manose, lactose, sacarose, salicina, xilose, arabinose, glicerina, celobiose, melezitose, rafinose, sorbitol, raminose, trealose, gelatina, manitol e urease, e as provas de esculina, indol e catalase.

Ainda foram observadas a capacidade de crescimento em meio seletivo BGA (*Bacteroides gingivalis* agar), segundo Coykendal et al. (1980), comparando-se com o crescimento em CDC, e formação de pigmento fluorescente quando submetidas à luz ultravioleta de comprimento longo, de acordo com Shah (1979).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De culturas totais de material obtido diretamente da bolsa peridentária dos pré-molares decíduos maxilares de animais com lesões ativas de CI, foram isoladas 120 amostras de bactérias anaeróbias estritas. Baseando-se na observação da formação de pigmento aos 7 e 14 dias de incubação em meio de cultivo CDC e nas características quanto à forma, aspecto do bordo e elevação das colônias, foi possível distinguir quatro grupos bacterianos (Quadro 1). Foi observada uma correlação quanto ao aspecto do crescimento bacteriano, isolando-se os mesmos

Quadro 1. Aspectos do crescimento em meio de cultura CDC, dos principais grupos de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos (CI)

Característica da colônia	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Pigmentação após 7 e 14 dias de incubação	Negra	Marrom	Azul	Amarela
Forma	Esférica	Esférica	Esférica	Esférica
Aspecto do bordo	Regular liso	Regular liso	Regular liso	Irreg. ondulado
Elevação	Convexa	Convexa	Plana	Umbilicada

grupos dos 4 animais estudados. Os microrganismos cultivados apresentaram ainda características comuns, crescendo bem em meio de cultura contendo hemina, vitamina K₁ e sangue. Quanto ao aspecto morfológico, as bactérias dos 4 grupos foram Gram negativas e apresentaram formas variáveis de pequenos bacilos, com poucas formas cocoides e alguns filamentos longos. As formas filamentosas foram mais comuns nas amostras pigmentadas de negro (Grupo 1) em culturas com mais de 7 dias de incubação.

As amostras que apresentaram pigmentação marrom das colônias após 7 e 14 dias de incubação deveriam ser observadas aos 21 dias ou mais para verificar uma eventual produção de pigmento negro mais tardiamente, o que parece ocorrer freqüentemente em algumas espécies de *Bacteroides* (Krieg & Holt 1984). No entanto esta obser-

⁶ Sistema Gaspack, Cockeysville, Maryland, EUA.

⁷ Api System S.A., Montalieu Vercieu, França.

vação não pôde ser realizada. Um fato observado no desenvolvimento dos trabalhos de isolamento foi a dificuldade de manutenção de amostras como culturas puras. Diversos fatores são citados como limitantes ao isolamento e manutenção de culturas de anaeróbios não esporulados, dentre eles a utilização de técnicas adequadas, condições de anaerobiose e meios de cultivo (Dowell & Hawkins 1968, Dowell Jr. 1970). Várias tentativas de isolamento de amostras foram ineficientes, as amostras cresceram bem somente em culturas mistas, sendo difícil a sua manutenção como culturas puras através de subcultivos. Diversas amostras pigmentadas de negro, após um ou dois subcultivos cresceram mas não produziram o pigmento característico. Estes fatores podem ser explicados em parte, segundo Duerden (1980), pelas características nutricionais de diferentes espécies de *Bacteroides* que são complexas e ainda não bem esclarecidas.

Das 120 amostras isoladas, foram escolhidas ao acaso 52 amostras para verificação do perfil bioquímico pelo Sistema API 20 A. Destas, 25 pertenciam ao Grupo 1, 13 ao Grupo 2, 8 ao Grupo 3 e 6 ao Grupo 4. Os resultados obtidos estão registrados nos Quadros 2, 3 e 4. De acordo com os critérios estabelecidos para interpretação e análise

Quadro 2. Perfil bioquímico de 25 amostras de colônias de bactérias pigmentadas de negro, isoladas de lesões peridentárias da CI, determinado pelo Sistema API 20 A, da fluorescência e do crescimento em BGA

	Número de amostras caracterizadas											
	1	1	1	1	1	5	1	1	4	1	1	7
Indol	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Esculina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Manose	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
Fluorescência	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
BGA ^b	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-

^a - Reação negativa, + reação positiva.
^b + Crescimento, - nenhum crescimento.

taxonômica, os microrganismos constantes dos Quadros 2 e 3 pertencem ao gênero *Bacteroides*. As dificuldades surgiram, no entanto, quando se pretendeu fazer a classificação em nível de espécie. Das 38 amostras pigmentadas de negro ou marrom estudadas, 15 foram não fer-

Quadro 3. Perfil bioquímico de 13 amostras de colônias de bactérias pigmentadas de marrom isoladas de lesões peridentárias da CI, determinado pelo Sistema API 20 A, da fluorescência e do crescimento em BGA

	Número de amostras caracterizadas								
	1	2	2	1	1	3	1	1	1
Indol	- ^a	-	+	+	+	+	-	-	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Glicose	+	-	-	-	-	+	+	-	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Maltose	-	-	-	+	-	+	+	-	+
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Gelatina	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manose	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Catalase	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Fluorescência	-	+	-	+	-	+	-	-	+
BGA ^b	-	+	-	-	-	-	+	-	+

^a - Reação negativa, + reação positiva.
^b + Crescimento, - nenhum crescimento.

Quadro 4. Perfil bioquímico de amostras de bactérias anaeróbias, pertencentes aos Grupos 3 e 4, isoladas de lesões peridentárias da CI, determinado pelo Sistema API 20 A, e capacidade de crescimento em BGA

	Número de amostras caracterizadas									
	Grupo 3							Grupo 4		
	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2
Indol	- ^a	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Manitol	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerina	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Manose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGA ^b	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-

^a - Reação negativa, + reação positiva.
^b + Crescimento, - nenhum crescimento.

mentativas e apresentaram perfil semelhante ao *Bacteroides asaccharolyticus*, enquanto que as 23 restantes não se enquadraram em qualquer das espécies descritas. Estas amostras apresentaram graus diferentes de fermentação ou hidrólise de substratos, algumas com características comuns, outras apenas individuais, sendo, desta maneira, classificadas como *Bacteroides* sacarolíticos pigmentados de negro ou marrom. As amostras englobadas no Grupo 3 apresentaram freqüentemente capacidade de fermentação em diversos açúcares testados, sendo que apenas uma foi indol positiva. Com este perfil bioquímico, foram caracterizadas como *Bacteroides* não pigmentados de negro. A mesma dificuldade surgiu quando nenhuma das amostras apresentou perfil semelhante às espécies já descritas na literatura e que são consideradas pelo Sistema API 20 A.

As 6 amostras pertencentes ao Grupo 4 foram caracterizadas como *Fusobacterium nucleatum*, segundo o Manual do Sistema API 20 A, embora o aspecto morfológico da colônia seja diferente daquele descrito na literatura.

A maioria das amostras estudadas foi catalase negativa, no entanto, algumas amostras, pigmentadas de negro ou marrom foram positivas. Esta condição tem sido descrita para amostras assacarolíticas isoladas de cães Beagle (Syed 1980).

Adicionalmente, outras 68 amostras de bactérias pertencentes aos 4 grupos isolados forma acrescentados aos estudos da capacidade de crescimento em meio de cultura BGA e formação de pigmento fluorescente, perfazendo-se assim um total de 120 amostras. Os resultados são apresentados nos Quadros 5, 6 e 7.

Todos os grupos foram capazes de crescer em BGA, com diferentes intensidades e variações quando comparados ao crescimento em CDC. Das 40 amostras pigmenta-

Quadro 5. Aspectos do crescimento em BGA e da fluorescência aos 7 e 14 dias de amostras de bactérias com colônias pigmentadas de negro isoladas de lesões da CI

Bovino n ^o	Número de amostras testadas	Crescimento em BGA ^a			Fluorescência	
		+	±	-	7 dias	14 dias
0039	10	4	2	4	7	5
0052	10	8	0	2	6	5
0065	10	5	0	5	6	6
0092	10	4	2	4	5	5

^a + Crescimento abundante, comparável ao crescimento em CDC, ± pouco crescimento, - nenhum crescimento.

Quadro 6. Crescimento em BGA e fluorescência aos 7 e 14 dias de amostras de bactérias com colônias pigmentadas de marrom isoladas de lesões da CI

Bovino n ^o	Número de amostras testadas	Crescimento em BGA ^a			Fluorescência	
		+	±	-	7 dias	14 dias
0039	10	4	0	6	2	2
0052	10	4	0	6	2	2
0065	10	3	1	6	3	3
0092	10	3	1	6	2	2

^a + Crescimento abundante, comparável ao crescimento em CDC, ± pouco crescimento, - nenhum crescimento.

Quadro 7. Crescimento das amostras de bactérias anaeróbias estrictas, classificadas nos Grupos 3 e 4, em meio de cultura BGA

Bovino n ^o	Número de amostras testadas por grupo	Resultado do crescimento ^a					
		Grupo 3			Grupo 4		
		+	±	-	+	±	-
0039	5	2	2	1	1	2	2
0052	5	1	2	2	1	1	3
0065	5	1	1	3	2	0	3
0092	5	1	1	2	2	0	3

^a + Crescimento abundante, comparável ao crescimento em CDC, ± pouco crescimento, - nenhum crescimento.

das de negro testadas, 24 apresentaram pelo menos alguma capacidade de crescimento em BGA, enquanto que das pertencentes ao Grupo 2, 15 amostras foram positivas. Em relação à fluorescência, as amostras pertencentes aos Grupos 3 e 4 foram negativas, enquanto que 24 e 9 das amostras pigmentadas de negro ou marrom testadas foram positivas. Shah et al. (1979) descrevem que para amostras pigmentadas de negro, a fluorescência sob luz ultra-violeta foi estável na maioria dos isolamentos depois que as colônias se tornaram totalmente pigmentadas e que algumas culturas velhas podem perder a capacidade de produzir fluorescência. No presente estudo foram observados diferentes comportamentos em relação à esta descrição. Algumas amostras fluorescentes aos 7 dias de incubação apresentaram fluorescência fraca aos 14 dias, e amostras com fluorescência fraca na primeira observação foram negativas na segunda.

A capacidade de crescimento em BGA e de formação de pigmento fluorescente é considerada critério de triagem para o isolamento e caracterização inicial de microrganismos pertencentes ao gênero *Bacteroides*. O meio seletivo BGA (*Bacteroides gingivalis* agar) teoricamente inibiria o crescimento de grande número de amostras, favorecendo o crescimento de outras, que, em sendo não fermentativas e não fluorescentes, possivelmente se caracterizariam como *Bacteroides gingivalis* (Coykendall et al. 1980). O meio de cultura BGA não demonstrou, no entanto, eficiência na seletividade em relação às amostras isoladas de bezerras com CI, uma vez que todos os grupos, com diferentes perfis bioquímicos, se mostraram capazes de crescer neste meio. Não se observou nenhuma relação estreita entre o crescimento em BGA e a fluorescência.

Os resultados obtidos evidenciam a presença de grupos específicos de bactérias Gram negativas não esporuladas nas lesões peridontárias da CI, com predominância de *Bacteroides* spp. pigmentados de negro e marrom, sacarolíticos e não sacarolíticos, de *Bacteroides* spp. não pigmentados e fermentativos e de *Fusobacterium nucleatum*, e corroboram com os trabalhos de Blobel et al. (1984) e Dutra et al. (1986). Estudos taxonômicos adicionais, com a utilização de técnicas mais precisas como a análise cromatográfica dos produtos metabólicos finais e a determinação do conteúdo de citosina e guanina (C + G) do DNA celular, são necessários caso se pretenda

identificar corretamente as espécies de bactérias presentes nas lesões periodontárias progressivas da doença e verificar sua participação na etiopatogenia da CI.

REFERÊNCIAS

- Blobel H., Döbereiner J., Lima F.G.F. & Rosa I.V. 1984. Bacterial isolation from "Cara inchada"-lesions of cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 4(2): 73-77.
- Coykendall A.I., Kaezmarek F.S. & Slots J. 1970. Genetic heterogeneity in *Bacteroides asaccharolyticus* (Holdeman and Moore 1970) *Finegold and Barnes* 1977 (Approved Lists, 1980) and proposal of *Bacteroides gingivalis* sp. nov. and *Bacteroides macacae* (Slots and Genco) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:559-564.
- Döbereiner J. 1990. Zur Ätiologie der "cara inchada", einer periodontalen Erkrankung der Junggrinder in Brasilien. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 97:482-490.
- Döbereiner J., Inada T. & Tokarnia C.H. 1974. "Cara inchada" doença periodontária em bovinos. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.* 9:63-85.
- Dowel Jr. V.R. 1970. Anaerobic infections, p. 15. In: *Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections*. American Public Health Assoc., New York.
- Dowel Jr. V.R. & Hawkins T.M. 1968. *Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology*. National Center for Disease Control, Atlanta, p. 1803.
- Duerden B.J. 1980. The isolation of *Bacteroides* spp. from the normal human gingival flora. *J. Med. Microbiol.* 13:89-100.
- 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.
- Dutra I.S., Matsumoto T. & Döbereiner J. 1993. Surtos de periodontite em bezerras ("cara inchada") associados ao manejo do solo. *Pesq. Vet. Bras.* 13(1/2):1-4.
- Holdeman I.V. Cato E.P. & Moore W.E.C. 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed. VPI Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, p. 58.
- Krieg N.R. & Holt J.C. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Loesche W.J. 1969. Oxygen sensitivity of carious anaerobic bacteriae. *Appl. Microbiol.* 18(5):723-727.
- Shah H. 1979. The porphyrin pigmentation of subspecies of *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochem J.* 180:45-50.
- Syed S.A. 1980. Characteristics of *Bacteroides asaccharolyticus* from dental plaques of Beagle dogs. *J. Clin. Microbiol.* 11(5):522-526.

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS COM BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE *Senna occidentalis* (Leg. Caes.) NA RAÇÃO¹

UBIRAJARA RODRIGUES², FRANKLIN RIET-CORREA² e NELSON MORES³

ABSTRACT.- Rodrigues U., Riet-Correa F., Mores N. 1993. [Experimental intoxication in pigs fed with low concentrations of *Senna occidentalis* (Leg. Caes.) in the ration.] Intoxicação experimental em suínos com baixas concentrações de *Senna occidentalis* (Leg. Caes.) na ração. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(3/4):57-66. Laboratório Regional de Diagnóstico, Fac. Vet., UFPel, Campus Universitário, Pelotas, RS 96010-900, Brazil.

Thirty pigs with mean weight of 27.5 kg were divided at random in five groups. Group 1 (control) was fed with a growing ration from day 0 to day 42, and with a finishing ration from day 43 to day 90. Groups 2, 3, 4 and 5 received the same ration as the control group plus 0.25%, 0.50%, 0.75% and 1.00% respectively of ground *Senna occidentalis* (L.) Link. seeds. The regression analysis showed a negative linear regression of growth rates ($\hat{y} = 0.75 - 0.36x$, $r^2 = 0.92$, $(P < 0.01)$) and food consumption ($\hat{y} = 1.98 - 0.82x$, $r^2 = 0.93$, $(P < 0.07)$) of growing and finishing pigs in relation with the concentration of *S. occidentalis* in the food. Four pigs of group 5 and one of group 3 had clinical signs at 54, 59, 78 (two pigs) and 81 days after the beginning of the experiment. These pigs were killed *in extremis* until 72 hours after the onset of clinical signs. Three pigs from group 5 and three from group 4 were killed 56 and 57 days after the beginning of the experiment. The other pigs, except three from the control group, were killed *in extremis* at the end of the experiment. Post mortem findings were enlargement of the liver, which had pale areas of discoloration and accentuation of its lobular pattern, in 9 pigs from groups 3, 4 and 5, one of which had a nutmeg appearance on the cut surface. No gross lesions were observed in skeletal muscles or myocardium in any of the pigs. Histological lesions of the liver were characterized by hepatocellular fat metamorphosis and discrete bile duct proliferation. One pig had centrilobular necrosis probably resultant from cardiac failure. Degeneration and segmental necrosis of fibers were observed in skeletal muscles. The degree of these lesions was correlated directly with the quantity of *S. occidentalis* seeds in the ration. Mild degenerative lesions were observed in the myocardium of some pigs from groups 3, 4 and 5.

INDEX TERMS: Poisonous plants, swine diseases, *Senna occidentalis*, *Cassia occidentalis*, Leg. Caesalpinioideae, toxic myopathies, hepatotoxicosis, pathology.

SINOPSE.- Trinta suínos com peso inicial médio de 27,15 kg foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de tratamento. O grupo 1 (controle) recebeu ração de crescimento do dia 0 ao 42º dia de experimento e ração de terminação do 43º ao 90º dia. Os grupos 2, 3, 4 e 5 receberam, durante o mesmo período, a mesma ração do grupo controle, porém contendo 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,00% de sementes de *Senna occidentalis* (L.) Link., respectivamente. A análise de regressão demonstrou uma relação linear negativa para o ganho de peso ($\hat{y} = 0,75 - 0,36x$, $r^2 = 0,92$,

$(P < 0,01)$) e o consumo alimentar ($\hat{y} = 1,98 - 0,82x$, $r^2 = 0,93$, $(P < 0,07)$), em relação à concentração de *S. occidentalis* na ração, nas fases de crescimento e terminação. Cinco animais, quatro do grupo 5 e um do grupo 3, apresentaram sintomas de incapacitação muscular no 54º, no 59º, no 78º (dois animais) e 81º dias de experimento. Esses animais foram sacrificados *in extremis* até 72 horas após o início dos sintomas. Três suínos do grupo 4 e três do grupo 5 foram sacrificados no 56º e no 57º dias após o início do experimento (um desses com sintomas) e os restantes nos últimos 12 dias do experimento, com exceção de 3 animais controle que não foram sacrificados. Nas necropsias, o fígado de nove suínos dos grupos 3, 4 e 5 apresentou aumento de tamanho e áreas de coloração mais clara com acentuação do padrão lobular; em um suíno foi observado aspecto de noz-moscada na superfície de corte desse órgão. Nos músculos esqueléticos e cardíaco não foram observadas lesões macroscópicas. Histologicamente observou-se uma moderada degeneração gordurosa e uma leve proliferação de células epiteliais dos ductos biliares no fígado. Um animal apresentou acentuada necrose centrolobular, provavel-

¹ Aceito para publicação em 8 de janeiro de 1993.

Trabalho realizado durante o curso de pós-graduação (M.Sc.) do primeiro autor na UFPel e apresentado no V Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Águas de Lindóia, 21-24 de outubro de 1991.

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e realizado em sua fase experimental, no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-CNPQA).

² Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, UFPel, Cx. Postal 354, Pelotas, RS 96010-900.

³ Embrapa-CNPQA, Cx. Postal D-3, Concórdia, SC 89700-000.

mente devido a insuficiência cardíaca. Os músculos esqueléticos apresentaram necrose segmentar e alterações regenerativas. O grau de lesão muscular esteve positivamente correlacionado com a concentração de *S. occidentalis* na ração. O músculo cardíaco apresentou processo degenerativo pouco acentuado em alguns animais dos grupos 3, 4 e 5.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, doenças dos suínos, *Senna occidentalis*, *Cassia occidentalis*, Leg. Caesalpinoideae, miopatia tóxica, hepatopatia tóxica, patologia.

INTRODUÇÃO

Senna occidentalis designada anteriormente como *Cassia occidentalis*, cujo nome vulgar é fedegoso, tem sido descrita como planta tóxica para várias espécies animais (Brocq-Rousseau & Bruere 1925, Henson et al. 1965, Colvin et al. 1986). A planta é reconhecida como causadora de miopatia, cardiomiopatia e hepatopatia. Experimentalmente a intoxicação já foi reproduzida em bovinos (Dollahite & Henson 1965, O'Hara et al. 1970, Barros et al. 1990), eqüinos (Moussu 1925, Martin et al. 1981, Irigoyen et al. 1991), suínos (Colvin et al. 1986, Martins et al. 1986), ovinos (Dollahite et al. 1964, Dollahite & Henson 1965), caprinos (Dollahite & Henson 1965), aves (Simpson et al. 1971, Torres et al. 1971, Graziano et al. 1983) e coelhos (Dollahite et al. 1964, Dollahite & Henson 1965, O'Hara & Pierce 1974a,b).

A planta é uma leguminosa anual encontrada em pastagens, ao longo de beira de estradas ou como invasora de lavouras de milho, soja e sorgo (Schmitz & Denton 1977, Colvin et al. 1986), em pastagens de várzeas ou em solos ricos bastante fertilizados (O'Hara et al. 1969). Todas as partes da planta são tóxicas (Dollahite et al. 1964, Mercer et al. 1967), mas é nas sementes que a toxidez é maior (Dollahite et al. 1964, Martins et al. 1986). Experimentalmente tem-se demonstrado que a planta possui efeito acumulativo (Mercer et al. 1967, Rogers et al. 1979, Barros et al. 1990, Irigoyen et al. 1991).

No Brasil, a principal forma de intoxicação tem sido descrita quando os animais ingerem rações contaminadas com sementes da planta. Surtos de intoxicação já foram relatados em aves no Estado de São Paulo (Torres et al. 1971, Butolo 1972), suínos em Santa Catarina (Martins et al. 1986) e bovinos no Rio Grande do Sul (Barros et al. 1990).

Os objetivos do presente trabalho foram verificar a influência de baixas concentrações (menores ou iguais a 1%) de sementes de *S. occidentalis* na ração sobre o desempenho de suínos em crescimento e terminação, determinar os quadros clínico e anatomo-patológico da intoxicação e contribuir para o esclarecimento da patogenia da intoxicação.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes utilizadas. As sementes de *S. occidentalis* (L.) Link.⁴ foram colhidas em abril de 1989 no Município de Caxambú do Sul, oeste do Estado de Santa Catarina. Realizou-se a colheita

das sementes com vagens, procedendo-se posteriormente a limpeza e seleção das mesmas. Obtiveram-se aproximadamente 30kg de sementes livres de vagens, com uma percentagem de 95% de pureza. As sementes eram conservadas em congelador e, por ocasião do preparo das dietas experimentais, separava-se apenas uma quantidade suficiente para uso, a qual era moída.

Animais experimentais. Foram utilizados 30 leitões (Large White x Landrace x Duroc), sendo 10 fêmeas e 20 machos castrados, com peso inicial médio de 27,15 kg.

Duração do experimento. A duração total do experimento foi de 90 dias, sendo que os dias 0 a 42 correspondem ao período de crescimento e os dias 42 a 90 à fase de terminação. A passagem do período de crescimento para terminação foi determinada quando o peso médio dos animais do grupo controle era de 55,70kg, o que ocorreu aos 42 dias de experimento. A finalização do experimento ocorreu quando o grupo controle atingiu um peso médio de 92,76 kg, aos 84 dias do início do experimento.

Delineamento experimental. O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, usando-se duas baias cada qual com três animais por tratamento, perfazendo um total de 30 animais experimentais.

Os tratamentos foram constituídos de diferentes níveis de administração de sementes moídas de *S. occidentalis* a uma ração basal, conforme segue:

- Grupo T 1: Ração basal (controles);
- Grupo T 2: Ração basal + 0,25% de sementes moídas;
- Grupo T 3: Ração basal + 0,50% de sementes moídas;
- Grupo T 4: Ração basal + 0,75% de sementes moídas;
- Grupo T 5: Ração basal + 1,00% de sementes moídas.

Dietas experimentais. As dietas foram elaboradas para atender às exigências nutricionais para suínos estabelecidas pelo National Research Council, NRC (1988). As sementes de *S. occidentalis* previamente moídas foram adicionadas às dietas nas proporções anteriormente mencionadas.

O Quadro 1 mostra a composição percentual das dietas experimentais nas fases de crescimento e terminação.

Ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar. Os animais foram pesados individualmente a cada 14 dias, obtendo-se três pesagens durante a fase de crescimento (14, 28 e 42 dias do início do experimento) e três pesagens durante a fase de terminação (56, 70 e 84 dias do início do experimento). Não foi possível fazer o controle individual do consumo de ração; os dados coletados referem-se ao consumo total de ração de cada baia. O controle do consumo de ração foi feito a cada 14 dias, por ocasião da pesagem dos animais. Obteve-se o consumo total de cada tratamento no dado período, somando-se o consumo total de cada baia com o mesmo tratamento.

A conversão alimentar média de cada tratamento foi obtida tomando-se como base o ganho de peso e consumo de ração de cada tratamento, num dado período. As variáveis ganho de peso e consumo de ração nos respectivos períodos de crescimento e terminação, foram submetidas a uma análise de regressão, segundo o método de mínimos quadrados (Statistical Analysis System - SAS, 1985).

Observações clínicas. O controle do estado de saúde dos animais foi realizado diariamente, observando-se o seu comportamento perante o grupo controle acrescido de exame clínico individual com atenção ao apetite, temperatura, aspecto das fezes e urina, disposição em movimentar-se e funcionamento do sistema muscular.

Necropsia e colheita de material para estudos histopatológicos. O sacrifício, seguido de necropsia e colheita de material para histopatologia, foi realizado em três animais do grupo T4 e três

⁴ Identificação realizada pelo Engenheiro Agrônomo João André Jarankow, Instituto de Biologia, UFPel, Pelotas, RS.

Quadro 1. Composição percentual das dietas experimentais nas fases de crescimento e terminação em suínos alimentados com rações com diferentes concentrações de sementes de *Senna occidentalis*

Ingredientes	Crescimento					Terminação				
	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
Milho moído	72,01	72,01	72,01	72,01	72,01	78,42	78,42	78,42	78,42	78,42
Óleo de soja	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Farelo de soja	22,66	22,66	22,66	22,66	22,66	16,48	16,48	16,48	16,48	16,48
Fosfato bicálcico	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Farinha de ostras	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
Sal	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
MMVA	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Caulin ^b	1,00	0,75	0,50	0,25	0	1,00	0,75	0,50	0,25	0
Sementes moídas de <i>S. occidentalis</i>	0	0,25	0,50	0,75	1,00	0	0,25	0,50	0,75	1,00

^a Mistura de microminerais e vitaminas para suínos em fase de crescimento e terminação.

^b Material inerte.

animais do grupo T5 nos 56^o e 57^o dias do experimento. Os demais animais foram sacrificados até 72 horas após aparecimento de sinais de incapacitação muscular ou nos últimos 12 dias do experimento, com exceção de três animais do grupo controle, que não foram sacrificados.

Os tecidos colhidos para histopatologia foram: coração, pulmão, estômago, fígado, pâncreas, baço, rins, intestino delgado, intestino grosso, parótida, paratireóide, tireóide, adrenal, linfonodos mesentéricos, sistema nervoso central (córtex, cápsula interna, tálamo, tubérculos quadrigêmeos, cerebelo, ponte, bulbo, medula cervical, torácica e lombar), músculos esqueléticos (diafragma, intercostais, supra-espinal, braquial, bíceps femural, quadríceps femural, semitendinoso, glúteo médio, longo dorsal, masseter e língua). Esses tecidos foram fixados em solução tampoadora de formol a 10%, incluídos em parafina, cortados a uma espessura de 5 micrômetros e corados pela Hematoxilina e Eosina (HE). Cortes de congelamento do fígado foram corados pelo Sudan III (Santos 1987). A coloração do tricrômico de Masson (Beçak & Paulete 1976) foi utilizada para cortes histológicos de fígado.

Com objetivo de realizar-se uma análise microscópica quantitativa de lesões musculares, procedeu-se um estudo histomorfométrico dos músculos longo dorsal, semitendinoso e do diafragma. Para tal, utilizou-se uma lente de sobreposição traçada com uma grade de linhas e pontos acoplada à ocular de um microscópio de luz polarizada. Com um aumento de 25X determinou-se o grau médio de lesão de cada músculo, calculando-se a relação entre área lesada e área total compreendida nos limites da grade e multiplicando-se o valor obtido por 100, expressando-se o resultado em percentual de área lesada. As médias do grau de lesão de cada músculo foram analisadas estatisticamente pela análise de regressão.

Exames laboratoriais. Foram obtidos 10ml de sangue por punção da cava superior de três suínos de cada um dos tratamentos, no primeiro dia de experimento e no primeiro dia da fase de terminação. Também realizou-se a colheita semanal de sangue dos animais do grupo de tratamento 4 e 5 a partir do 56^o dia do início do experimento. Foram tomadas amostras de todos os animais no momento da necropsia. Após centrifugação, o soro foi congelado a -20°C até a realização dos exames⁵. Para determinação de aspartato aminotransferase (AST) sérica foi utilizado o Kit Tran-

saminases⁶ pelo método Reitman e Frankel. Para determinação da creatinina quinase (CK) sérica foi usado um Kit CK - NAC⁶ pelo método UV Otimizado.

Foram colhidas 43 amostras de urina para pesquisa de mioglobina e hemoglobina em todos os animais no momento da necropsia e, diariamente, nos animais que apresentaram sintomas de incapacitação muscular. A determinação seguiu o método descrito por Blondheim et al. (1958).

RESULTADOS

Ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar. Nos Quadros 2 a 4 estão os resultados do ganho de

6 REACTOCLIN.

Quadro 2. Influência de rações com diferentes concentrações de sementes de *Senna occidentalis* sobre o ganho de peso médio diário de suínos de crescimento e terminação

Concentração de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração (%)	Grupo	Ganho de peso médio diário (kg)			
		0-42 dias	42-56 dias	0-56 dias	0-48 dias
0,00	T1	0,74	0,79	0,75	0,77
0,25	T2	0,60	0,74	0,64	0,71
0,50	T3	0,60	0,68	0,62	0,62
0,75	T4	0,40	0,47	0,41	nd ^a
1,00	T5	0,37	0,51	0,41	nd

^a Não determinado.

Quadro 3. Influência de rações com diferentes concentrações de sementes de *Senna occidentalis* sobre o consumo médio diário de ração em suínos em crescimento e terminação

Concentração de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração (%)	Grupo	Consumo de ração médio diário (kg)			
		0-42 dias	42-56 dias	0-56 dias	0-84 dias
0,00	T1	1,84	2,65	2,04	2,89
0,25	T2	1,51	2,19	1,68	2,04
0,50	T3	1,47	3,13	1,64	1,83
0,75	T4	1,16	1,60	1,27	nd ^a
1,00	T5	1,10	1,60	1,22	nd

^a Não determinado.

⁵ Exames realizados no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina da UFPel.

Quadro 4. Influência de rações com diferentes concentrações de sementes de *Senna occidentalis* sobre a conversão alimentar de suínos em crescimento e terminação

Concentração de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração (%)	Grupo	Conversão alimentar			
		0-42 dias	42-56 dias	0-56 dias	0-84 dias
0,00	T1	2,50	3,41	2,73	2,98
0,25	T2	2,53	2,96	2,64	2,96
0,50	T3	2,45	3,20	2,64	2,39
0,75	T4	3,30	3,55	3,16	nd ^a
1,00	T5	2,96	3,13	3,01	nd

^a Não determinado.

peso médio diário, consumo médio de ração e conversão alimentar em diferentes períodos experimentais para os cinco grupos de tratamentos. As Figs 1 e 2 representam a regressão linear do ganho de peso médio diário e do consumo médio de ração entre os dias 0 a 56 do experimento, enquanto que a Fig. 3 ilustra a variação no consumo de ração nesse mesmo período.

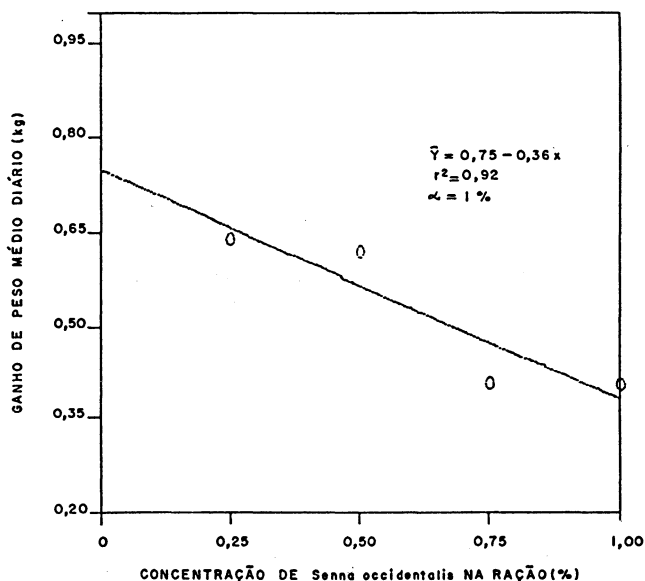


Fig. 1. Representação gráfica da regressão linear do ganho de peso médio diário calculado entre 0 e 56 dias experimentais, em suínos alimentados com rações com diferentes concentrações de sementes de *Senna occidentalis*.

Sinais clínicos. Durante o período de terminação cinco animais apresentaram sintomas caracterizados por distúrbios da locomoção. O aparecimento dos mesmos deu-se em quatro animais do grupo T5 no 54^o, no 59^o e dois animais no 78^o dias e em um animal do grupo T3 no 81^o dias do experimento. A evolução do quadro foi similar nos cinco animais. Inicialmente eles apresentaram um andar cuidadoso com dorso arqueado. Posteriormente a locomoção passou a ser dificultada, com andar cambaleante e tremores musculares nos membros posteriores. O quadro foi progressivo e, em 24 horas, os animais apresentaram relutância em caminhar, movimentando com dificul-

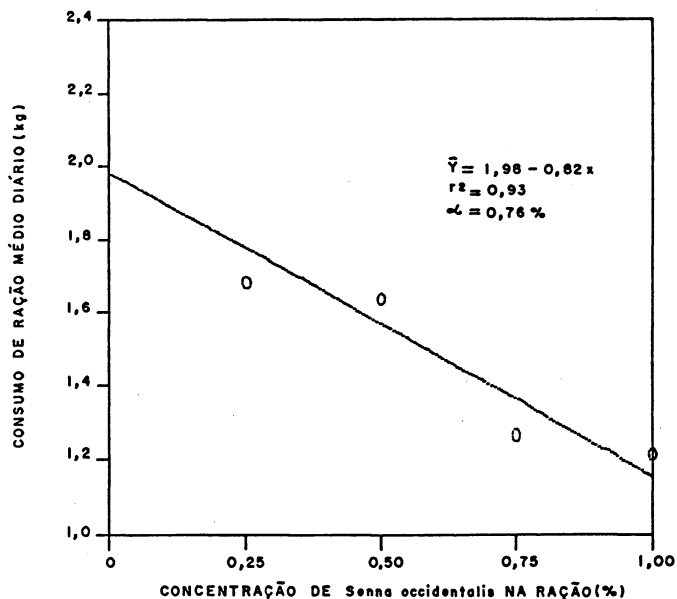


Fig. 2. Representação gráfica da regressão linear do consumo de ração médio diário calculado entre 0 e 56 dias experimentais, em suínos alimentados com rações com diferentes concentrações de sementes de *S. occidentalis*.

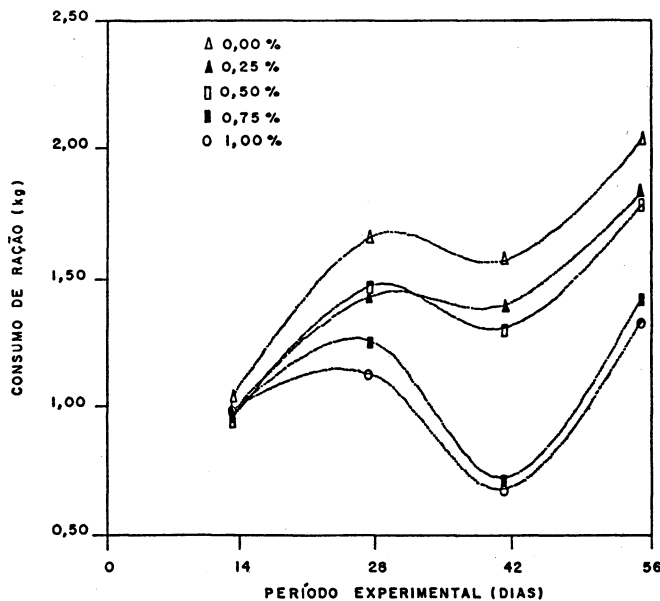


Fig. 3. Variação no consumo de ração de suínos alimentados com diferentes concentrações de sementes de *S. occidentalis*.

dade os membros posteriores. Tendiam a permanecer sentados sobre os membros posteriores (posição de cão sentado), e quando em pé permaneciam com os membros posteriores encostados um no outro. Os tremores musculares passaram a ser generalizados, sendo mais evidentes nos membros posteriores. Nas primeiras 24 horas do início dos sinais clínicos os animais permaneciam alertas e conservavam o apetite. Nas últimas horas, no entanto, apresentavam-se apáticos, com respiração laboriosa, fezes endurecidas e temperatura retal em torno de 38°C. Em 48 horas apresentaram acentuada dificuldade para se manter

em pé. Os animais que apresentaram sintomas de incapacitação muscular, foram sacrificados *in extremis* até 72 horas após o início dos mesmos. O Quadro 5 mostra os períodos experimentais em que foram realizadas as necropsias.

Quadro 5. Necropsias em suínos alimentados com diferentes concentrações de *Senna occidentalis* na ração

Dia do experimento	Animais necropsiados			
56 ^o	475(T5) ^a	343(T5)	345(T4)	
57 ^o	367(T5)	621(T4)	380(T4)	
59 ^o	392(T5) ^a			
78 ^o	594(T5) ^a			
81 ^o	349(T5) ^a	553(T4)		
84 ^o	656(T3) ^a	446(T4)	407(T3)	387(T4)
85 ^o	429(T3)	549(T3)	370(T3)	346(T2)
86 ^o	608(T2)	425(T2)	378(T2)	507(T1)
87 ^o	536(T2)	427(T2)	428(T1)	
90 ^o	421(T1)	615(T3)		

^a Animais que apresentaram sintomas de incapacitação muscular.

Exames laboratoriais. Não houve diferença significativa entre os valores médios das determinações das enzimas AST e CK entre o grupo controle e os demais grupos de tratamento.

Os resultados da determinação de mioglobina e/ou hemoglobina na urina foram negativos para todos os animais testados.

Achados de necropsia. Algumas lesões foram semelhantes para os diferentes tratamentos, variando apenas em intensidade e distribuição. Essas se caracterizavam pela presença de áreas mais claras que o restante do parênquima, perceptíveis através da cápsula. Dois suínos do grupo T5 (n^o 367 e 343) apresentaram lesão hepática

mais pronunciada. Em ambos o padrão lobular estava grupo T5 (n^o 367 e 343) apresentaram lesão hepática mais marcada por áreas do parênquima em que a coloração era mais clara e o volume do fígado estava aumentado. O suíno 475 (grupo T5) tinha o fígado aumentado de volume e na superfície capsular destacavam-se áreas focais de maior evidência dos lóbulos, devido à presença de áreas mais escuras ao centro e halo brancacento na periferia. A superfície de corte tinha aspecto de noz-moscada e a vesícula biliar apresentava parede espessa, edematosa e conteúdo xaroposo.

Alguns animais apresentaram outras lesões consideradas como incidentais e caracterizadas pelo aparecimento de petéquias na serosa e mucosa da bexiga, áreas de consolidação de cor vermelho-escura no parênquima pulmonar, pleurite fibrosa e lesões de rinite atrófica. Essas lesões estiveram presentes em graus variados em todos os tratamentos, inclusive entre os animais do grupo controle.

Exames histopatológicos. Em todos os animais que receberam sementes de *S. occidentalis*, na ração, predominaram os quadros hepatotóxico e mitótico. As lesões hepáticas foram constantes nos diferentes tratamentos, variando proporcionalmente em intensidade com a concentração de *S. occidentalis* presente na ração. Essas alterações caracterizavam-se por tumefação e presença de pequenos a médios vacúolos no citoplasma das células hepáticas. Essa vacuolização tinha distribuição difusa, porém mais acentuada nas regiões periportal e mediozonal. Pela coloração de Sudan III os vacúolos revelaram conter gordura. Alguns hepatócitos da região periportal mostraram aumento de volume com núcleos aumentados de tamanho e a cromatina marginada com halo claro circundando o nucléolo. Acompanhando essas alterações, podiam-se observar muitos hepatócitos com dois núcleos.

Quadro 6. Alterações histológicas no fígado de suínos alimentados experimentalmente com diferentes concentrações de *S. occidentalis*

Suíno n ^o	Concentração de sementes de <i>S. occidentalis</i> na ração (%)	Grupo	Alterações histológicas				
			Hepatócitos			Proliferação de células dos ductos	Neoformação de ductos
			Vacuolização do citoplasma	Hipertrofia	Necrose individual		
425	0,25	T2	(+) ^a	-	-	-	-
378	0,25	T2	(+)	-	-	-	-
594	0,50	T3	+	-	-	(+)	-
370	0,50	T3	+	+	+	-	+
407	0,50	T3	(+)	(+)	-	-	-
656	0,50	T3	(+)	-	(+)	-	-
380	0,75	T4	++	+	+	+	+
446	0,75	T4	++	+	+	-	-
621	0,75	T4	++	+	-	-	-
345	0,75	T4	-	+	-	-	-
475	1,00	T5	+++	++	+	++	+
349	1,00	T5	+	+	-	+	-
367	1,00	T5	+	+	+	+	+
594	1,00	T5	+	+	-	++	+
392	1,00	T5	+	++	-	++	-
343	1,00	T5	++	+	-	++	-

^a - Ausentes, (+) discretos, + leves, ++ moderados, +++ acentuados.

Alguns hepatócitos mostravam necrose individual, caracterizada por núcleos picnóticos, de distribuição multifocal. Houve discreta a moderada proliferação das células epiteliais dos ductos biliares no espaço porta e em alguns animais, observou-se neoformação de ductos biliares. Pela coloração do Masson não se evidenciou diferença entre animais do grupo controle e demais tratamentos na quantidade de tecido conjuntivo entre os lóbulos. O Quadro 6 esquematiza as alterações histopatológicas do fígado, para os diferentes tratamentos. O suíno 475 (grupo T5) apresentou lesões hepáticas distintas, caracterizadas por desaparecimento de hepatócitos na região centrolobular, havendo nessas áreas congestão e hemorragia. Circundando essa área central havia faixa de células hepáticas tumefeitas ou vacuolizadas (Sudan III positivo); essas lesões eram muito acentuadas na porção mediozonal e moderadas na periportal. Havia hepatócitos aumentados de volume na região periportal e muitos hepatócitos em necrose individual. Adicionalmente observaram-se formação de esférulas hialinas no citoplasma de hepatócitos e acentuada proliferação de células dos ductos biliares acompanhada por moderada fibrose (fibras coradas em verde pelo Masson).

As lesões histológicas dos músculos esqueléticos caracterizavam-se por necrose segmentar e processos regenerativos. Em alguns segmentos as miofibras mostravam aspecto hialino com perda das estriações, enquanto que em outros se observava fragmentação da miofibrila com áreas de aspecto flocular, infiltração de macrófagos e proliferação de células satélites. Muitas miofibras afetadas apresentavam perda do sarcoplasma com rompimento do mesmo. Nos casos mais severos havia infiltrado de neutrófilos e linfócitos. Outras miofibras mostravam um processo regenerativo caracterizado por núcleos centrais dispostos em filas. Na avaliação histomorfométrica as lesões no diafragma eram mais marcadas que as dos músculos semitendinoso e longo dorsal. O grau de lesões desses três músculos esteve positivamente correlacionado à concentração de *S. occidentalis* na ração (Fig. 4).

Lesões discretas estiveram presentes em fibras cardíacas de animais dos grupos T3, T4 e T5, com distribuição uniforme nas fibras das aurículas e dos ventrículos. Essas lesões foram mais acentuadas nos animais com sinais de

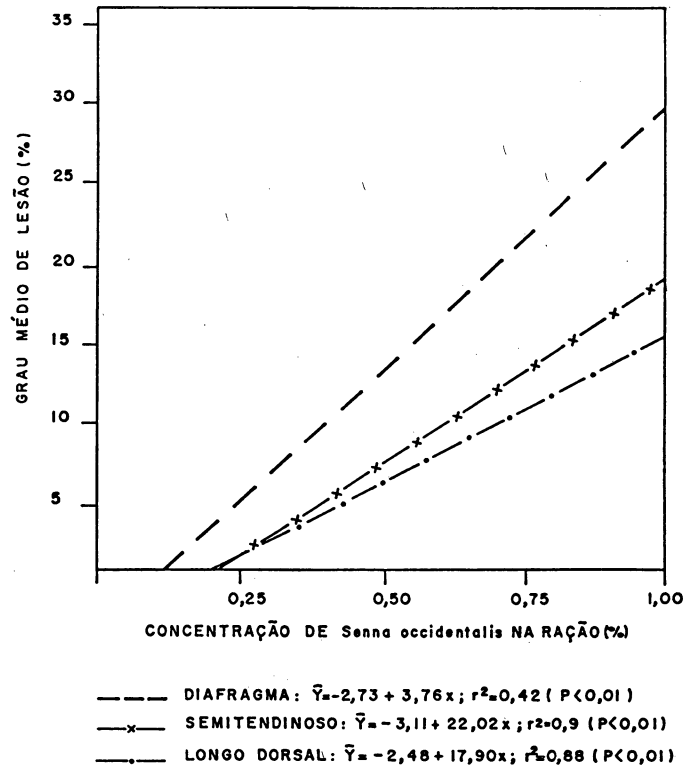


Fig. 4. Representação gráfica da regressão linear do grau de lesão muscular em função da concentração de *S. occidentalis* na ração.

incapacitação muscular (Quadro 7). Em algumas ocasiões observou-se degeneração hialina segmentar, caracterizada pela formação de massas eosinofílicas no sarcoplasma. Tumefação, vacuolização e presença de grandes vacúolos no sarcoplasma foram observadas somente nos animais 475 e 392 do grupo T5 e no animal número 621, do grupo T4. A área perinuclear das fibras vacuolizadas apresentava espaço claro. Muitos núcleos dos animais 475 e 392 encontravam-se aumentados de volume e disformes, havendo também núcleos picnóticos. Algumas fibras intactas, próximas à áreas de lesão apresentavam proliferação e aumento de volume de núcleos do sarcoplasma. Infiltrados celulares de macrófagos e neutrófilos estiveram presentes nos animais de números 446, 392 e 475.

Quadro 7. Alterações histológicas no miocárdio de suínos alimentados com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração

Suíno n ^o	Concentração de <i>S. occidentalis</i> na ração (%)	Grupo	Alterações histológicas				
			Degeneração hialina	Vacuolização do sarcoplasma	Núcleos aumentados de tamanho	Cariopícnose	Infiltração inflamatória
656	0,50	T3	(+) ^a	-	-	-	-
621	0,75	T4	++	+	-	-	-
345	0,75	T4	+	-	-	-	-
380	0,75	T4	+	-	-	-	-
446	0,75	T4	++	-	-	-	+
475	1,00	T5	++	+++	++	+	+
392	1,00	T5	++	++	++	+	+
194	1,00	T5	++	-	-	-	-

a - Ausentes, (+) discretos, + leves, ++ moderados, +++ acentuados.

Discretas áreas de necrose focal foram observadas no pâncreas dos animais números 407 (grupo T3), 446 (grupo T4) e 475 (grupo T5). No pulmão dos animais de todos os grupos foram encontradas lesões histológicas de pneumonia enzoótica. Os demais órgãos estudados não apresentaram lesões significativas.

DISCUSSÃO

Baixas concentrações de sementes de *S. occidentalis* na ração de suínos podem causar um efeito negativo no desempenho dos animais sem que apareçam os sinais clínicos característicos da intoxicação. Isso foi observado durante a fase de crescimento nos suínos dos grupos T4 e T5 e nas fases de crescimento e terminação para os grupos T2 e T3.

A análise de regressão para o ganho de peso e consumo de ração demonstrou uma resposta linear negativa, ou seja, a medida que aumentou a porcentagem de adição das sementes de *S. occidentalis*, esses parâmetros foram afetados negativamente de maneira proporcional, demonstrando que qualquer concentração de *S. occidentalis* na ração pode refletir negativamente na produção.

Em trabalhos experimentais com baixas concentrações de *S. occidentalis*, outros autores observaram uma influência negativa no ganho de peso dos animais. Na intoxicação em bovinos num período de 34 dias, Mercer et al. (1967) observaram uma perda de 5 a 10% do peso corporal. Em aves, concentrações variando entre 0,5% e 1,0% de sementes na ração reduzem significativamente o ganho de peso dos animais (Simpson et al. 1971, Graziano et al. 1983, Herbert et al. 1983), e em suínos Colvin et al. (1986) detectaram uma diferença de 460g diárias de ganho de peso entre animais que consumiram ração contendo 1,0% de sementes e animais controles, durante a fase de crescimento. Em nosso trabalho esta diferença entre o grupo controle e os animais que ingeriram ração contendo 1,0% de sementes foi de 370g diárias e 340g para os suínos que consumiram ração contendo 0,75% de sementes.

Uma influência negativa no consumo de ração também foi observada por Colvin et al. (1986) em experimento em suínos com ração a base de sorgo contaminado com 1,0%, 2,0% e 4,0% de sementes de *S. occidentalis*. Simpson et al. (1971), utilizando níveis de 0,5%, 1,0%, 2,0% e 4,0% de sementes na ração para aves, detectaram uma queda no consumo de ração para os níveis de 2,0% e 4,0%. Machado (1983) usando rações contaminadas por 0,5%, 1,0% e 2,0% de sementes de *S. occidentalis*, no período de 4 a 24 dias de vida das aves, observou uma diferença significativa no consumo de ração para os níveis de 1,0% e 2,0%, enquanto que num segundo experimento, no qual usou níveis de 0,1% a 0,5% de sementes, no período de 4 a 52 dias de vida das aves, o consumo alimentar foi significativamente menor para os níveis de 0,3% a 0,5%.

Considerando-se que não foram observadas diferenças significativas no índice de conversão alimentar entre os tratamentos, a ocorrência do menor ganho de peso dos

animais ingerindo *S. occidentalis* deve-se provavelmente, à queda no consumo de ração. A diminuição do consumo por sua vez pareceria estar diretamente relacionada ao efeito tóxico da *S. occidentalis* e não ao decréscimo na palatabilidade da ração ocasionada pela presença de sementes. Na Fig. 3 pode-se constatar que nos primeiros 14 dias o consumo de ração foi homogêneo para todos os grupos de tratamento, passando a haver maiores diferenças a partir dos 28 dias de experimentação, o que reforça a idéia de que a palatabilidade da ração com sementes de *S. occidentalis* não influenciou o consumo.

Sinais clínicos de disfunção muscular estiveram presentes em quatro suínos do grupo T5 e em um animal do grupo T3. Apesar dos sintomas terem se iniciado em diferentes dias dentro da fase de terminação, tiveram evolução e apresentação semelhantes.

Os principais achados de necropsia no presente estudo encontraram-se no fígado, caracterizados pela presença discreta a moderada de áreas de coloração mais clara que o restante do parênquima. Esse achado já foi descrito também na intoxicação por *S. occidentalis* em bovinos (Schmitz & Denton, 1977; Rogers et al. 1979), caprinos (Suliman et al. 1982) e aves (Torres et al. 1971). As alterações de maior evidência do padrão lobular e de hepatomegalia, assim como o aspecto de noz-moscada observadas em um animal do grupo T5, também foram descritas por Barros et al. (1990) na intoxicação experimental em bovinos, com doses suficientes para provocar a morte em cinco dias, e por Irigoyen et al. (1991) em equinos intoxicados com doses que provocaram a morte em até 60 horas. O aumento de volume do fígado com coloração mais clara que o normal, também foi descrito por Martins et al. (1986), em casos da intoxicação em suínos com ação contaminada com 10% e 20% de sementes e cujas mortes ocorreram num período de sete dias.

Lesões macroscópicas em músculos estriados, descritas por diversos autores e caracterizadas pelo aparecimento de áreas pálidas em bovinos (Dollahite & Henson 1965, Barros et al. 1990), aves (Torres et al. 1971, Schmitz & Denton 1977, Herbert et al. 1983), e suínos (Martins et al. 1986), não estiveram presentes em nenhum animal, mesmo naqueles que apresentaram sinais clínicos de incapacitação muscular. Observações semelhantes foram feitas em equinos por Martin et al. (1981) e também Irigoyen et al. (1991) em intoxicações experimentais em equinos que apresentaram sinais clínicos evidentes de disfunção muscular, sem apresentarem alterações macroscópicas.

A única alteração macroscópica do coração observada nos suínos deste estudo foi dilatação cardíaca (suíno 475), caracterizada pelo adelgaçamento das paredes ventriculares. O'Hara & Pierce (1974a) observaram este mesmo tipo de lesão em coelhos intoxicados experimentalmente por *S. occidentalis*.

As alterações histológicas observadas no fígado, caracterizadas por vacuolização difusa dos hepatócitos e

necrose individual, são lesões de aparecimento freqüente nos casos de intoxicação por *S. occidentalis*. Em bovinos já foram descritas por Dollahite & Henson (1965), Henson & Dollahite (1966), Mercer et al. (1967), Schmitz & Denton (1977), Rogers et al. (1979) e Barros et al. (1990); em caprinos por El Sayed et al. (1983); em aves por Graziano et al. (1983); em eqüinos por Irigoyen et al. (1991) e em suínos por Martins et al. (1986) e Colvin et al. (1986). Em nosso experimento, a vacuolização de hepatócitos esteve presente em animais de todos os grupos de tratamento, exceto no grupo controle, caracterizando-se pela presença de pequenas gotículas nos hepatócitos dando um aspecto esponjoso ao parênquima. Esta vacuolização foi mais acentuada nos animais do grupo T4 e para os animais que apresentaram sinais clínicos de incapacitação muscular do grupo T5. Apesar de ser de distribuição difusa, a vacuolização era mais pronunciada na região periportal e mediozonal. Na coloração de Sudan III estes vacúolos demonstraram conter gordura. Rubin & Farber (1990) classificam a degeneração gordurosa em macro e microvesicular, sendo que a microvesicular se apresenta com pequenos vacúolos de gordura dispersos em todo o citoplasma e o núcleo mantém sua posição central. Para esses autores, esse tipo de degeneração se deve a defeito metabólico básico que produz disfunção hepática, através de alterações nas mitocôndrias, perturbando a oxidação dos ácidos graxos. Essas afirmações corroboram com as observações feitas por Graziano et al. (1983) que sugeriram que *S. occidentalis* possui princípio(s) tóxico(s) capaz(es) de determinar uma depressão progressiva na atividade mitocondrial, comprometendo a produção energética da célula. Este mecanismo seria o responsável pela vacuolização subsequente observada nas células hepáticas.

A presença de hepatócitos aumentados de tamanho, principalmente na região periportal, nos animais dos grupos T3, T4 e T5 chama a atenção por ser uma alteração raramente descrita na intoxicação por *S. occidentalis*, tendo sido relatada apenas por Martins et al. (1986) na intoxicação em suínos.

Outra alteração a ser considerada é a proliferação das células epiteliais dos ductos biliares, observada principalmente nos animais que consumiram maior concentração de sementes de *S. occidentalis*. Este tipo de alteração tem sido constantemente associada a lesões crônicas do fígado e à cirrose (Rubin & Farber 1990). Segundo Kelly (1985), as reações crônicas do fígado frente a insultos tóxicos incluem fibrose, regeneração hepatocelular e regeneração de ductos biliares. Apesar da proliferação de células epiteliais dos ductos estar presente nos processos crônicos, acreditamos que as lesões observadas em nosso experimento caracterizam um processo subagudo, pois não observamos nenhum caso com uma lesão caracteristicamente crônica, com reações fibroblásticas proliferativas e fibrose.

A alteração histológica caracterizada por necrose centrolobular, observada no animal 475 do grupo T5, pode

ser devida a insuficiência cardíaca congestiva, já que esse animal apresentou lesão cardíaca grave com dilatação dos ventrículos. Possivelmente a anóxia ou hipóxia determinou a necrose dos hepatócitos centrolobulares e degeneração gordurosa na periferia dos lóbulos. Necrose centrolobular acompanhada de lesão cardíaca já foi observada em bovinos (Schmitz & Denton 1977, Rogers et al. 1979) e suínos (Martins et al. 1986). Outras alterações observadas no suíno 475, como aumento do volume dos hepatócitos das zonas mediozonal e periportal e proliferação dos ductos biliares, sugerem insulto tóxico, já que essas alterações também foram observadas em outros suínos que não apresentaram lesão cardíaca.

Nos músculos esqueléticos, lesões de características degenerativo-necrótico-regenerativas já foram descritas por muitos autores em casos de intoxicação por *S. occidentalis* em bovinos (Dollahite & Henson 1965, Henson et al. 1965, Henson & Dollahite 1966, Rogers et al. 1979, Barros et al. 1990), aves (Simpson et al. 1971, Herbert et al. 1983), eqüinos (Martin et al. 1981, Irigoyen et al. 1991) e suínos (Martins et al. 1986, Colvin et al. 1986). Segundo McGavin (1988), degeneração, necrose e regeneração de miofibras são respostas das células musculares à injúria e é resultado terminal de uma grande variedade de insultos, como isquemia, infarto, doenças metabólicas causadas por deficiências nutricionais, miopatia tóxica e infecções. Para esse mesmo autor, o sucesso da regeneração da miofibra lesada depende da extensão e natureza da injúria e se é ou não mantida a integridade do estroma de sustentação em torno da miofibra (tubo sarcolêmico). Neste trabalho a presença de figuras regenerativas foi mais acentuada nos grupos T2 e T3, indicando que nos casos em que as lesões foram mais discretas haveria melhores condições para o processo regenerativo, sendo que isto seria possível graças a manutenção dos tubos sarcolêmicos que garantiriam a preservação dos elementos necessários à regeneração. Miofibras em regeneração também foram observadas por Henson et al. (1965) em bovinos intoxicados com *S. occidentalis*, cujas lesões dos músculos eram pouco severas e se caracterizavam por uma ativação nuclear sarcolemal com proliferação e migração para o centro da fibra. O diafragma foi o músculo mais afetado, o que também já foi descrito por outros autores em intoxicação em suínos por *S. occidentalis*. (Martins et al. 1986, Colvin et al. 1986).

As alterações histológicas de fibras cardíacas estiveram presentes em alguns animais dos grupos T4 e T5 e um animal do grupo T3. Essas caracterizavam-se por hialinização segmentar das miofibras e formação de massas eosinófilas no sarcoplasma. Essas alterações são descritas por Van Vleet & Ferrans (1988) como degeneração miofibrilar, o que representa uma injúria subletal característica das células de musculatura cardíaca. Para O'Hara & Pierce (1974a) a degeneração miofibrilar, freqüentemente acompanhada por lesões vacuolares, é o início de uma degeneração sarcoplasmática e é uma reação da miofibra cardíaca ao declínio do metabolismo oxidativo pro-

vocada nas mitocôndrias por um fator tóxico presente em *S. occidentalis*.

Alguns autores têm comprovado o efeito acumulativo de *S. occidentalis* (Mercer et al. 1967, Rogers et al. 1979, Barros et al. 1990, Irigoyen et al. 1991) levando em consideração o quadro clínico e achados de necropsias semelhantes em animais que receberam uma mesma quantidade da planta em dose única ou em doses subdivididas. Tokarnia & Döbereiner (1984) em estudo com *Senecio brasiliensis*, discutiram a opinião de diversos autores sobre o efeito acumulativo e concluíram que o mesmo é caracterizado quando substâncias são eliminadas mais lentamente do que absorvidas. A ingestão de quantidade excessiva de uma substância tóxica desta natureza levaria a sintomas agudos e morte e uma dose muito pequena poderia não produzir efeito visível, porém, se pequenas doses fossem tomadas continuamente durante algum tempo e a rapidez da ingestão fosse, mesmo que somente um pouco, acima à da excreção, haveria um aumento gradual da substância tóxica no organismo até que quantidades suficientes fossem acumuladas, gerando manifestação dos sintomas. Assim as lesões anátomo-patológicas esperadas seriam de caráter agudo. Em nosso experimento, trabalhando com baixas concentrações de sementes por um período de 56 a 84 dias, observamos que pequenas doses (0,25% e 0,50%) determinaram lesões hepáticas degenerativas leves e presença de elementos regenerativos, e doses maiores (0,75% e 1,00%) determinaram lesões degenerativas mais acentuadas. Se a planta possuísse um efeito acumulativo era de se esperar o mesmo quadro histopatológico com lesões agudas para as diferentes concentrações de sementes, o que não ocorreu. Portanto a intoxicação com baixas concentrações de *S. occidentalis* não evidenciou um efeito acumulativo.

No diagnóstico de intoxicação por *S. occidentalis* em suínos é necessário fazer o diagnóstico diferencial de algumas patologias com lesões semelhantes às desta intoxicação. A distrofia muscular, a doença do coração de amora e a hepatose dietética fazem parte do complexo de doenças de suínos cuja provável etiologia é a deficiência de vitamina E e/ou selênio (Blood & Radostits 1989). Na doença do coração de amora e hepatose dietética os suínos são encontrados mortos ou apresentam um quadro clínico agudo. Na hepatose dietética observam-se lesões macroscópicas e histológicas do fígado, e em ambas as doenças ocorrem lesões degenerativas das arteríolas dos músculos estriados, que são mais marcadas no músculo cardíaco do que nos músculos esqueléticos (Simensen 1983, Taylor 1986, Blood & Radostits 1989). A distrofia muscular geralmente é um achado de necropsia no caso das duas doenças mencionadas anteriormente. No entanto, em porcas de primeira gestação, 48 horas após o parto, pode apresentar-se como uma entidade isolada (Blood & Radostits 1989). A necrose segmentar dos músculos, observada pela histologia nessas doenças, está acompa-

nhada de deposição de cálcio nas miofibras, fato raro na intoxicação por *S. occidentalis*. Na síndrome do estresse dos suínos também pode-se observar necrose dos músculos esqueléticos e cardíaco, que se diferencia da intoxicação por *S. occidentalis* por apresentar um quadro agudo com dispnéia, hipertermia e morte (Blood & Radostits 1989). A intoxicação por gossipol, que causa um quadro clínico-patológico similar ao da intoxicação por *S. occidentalis*, pode ser diferenciada desta última pelos dados epidemiológicos, pelas lesões cardíacas que são mais marcadas do que as dos músculos esqueléticos e pela presença de edema generalizado e de líquido nas cavidades corporais (Jones & Hunt 1983). Os quadros clínico e anatomo-patológico da intoxicação por *S. occidentalis* são muito similares aos observados na intoxicação por monensina, tiamulina e salinomina (Van Vleet et al. 1983, Umemura et al. 1985, Miller et al. 1986), antibióticos utilizados para suínos como promotores do crescimento (monensina e salinomina) e para o controle da disenteria suína (tiamulina). O diagnóstico diferencial deve ser realizado através da investigação da presença desses antibióticos ou de sementes de *S. occidentalis* na ração. Em nosso meio ainda é importante o diagnóstico diferencial com a aflatoxicose. Nessa doença, assim como na intoxicação por *S. occidentalis*, pode ocorrer um menor ganho de peso dos animais devido à menor eficiência alimentar. No entanto, nessa micotoxicose as lesões hepáticas diferem das observadas na intoxicação por *C. occidentalis*, e não ocorrem lesões musculares (Leman 1986). É muito importante também o diagnóstico diferencial da intoxicação por baixas concentrações de *S. occidentalis* com outros fatores alimentares, sanitários ou de manejo que causam diminuição no desempenho produtivo dos suínos. Para isso, além de pesquisa sobre possível presença de *S. occidentalis* na ração, deve-se realizar o estudo histológico dos músculos esqueléticos, já que a necrose segmentar dos mesmos foi a única alteração presente em todos os animais que ingeriram as sementes. As lesões histológicas de miocárdio foram discretas e não ocorreram nos grupos com menor concentração de *S. occidentalis*, enquanto que as lesões hepáticas são inespecíficas e pouco frequentes nos suínos.

A intoxicação por *S. occidentalis* em nosso meio pode ter assumido um papel importante devido à contaminação de rações feitas com cereais previamente contaminados com as sementes da planta. Casos agudos de intoxicação com alta mortalidade de animais já foram descritos por Martins et al. (1986), em dois surtos de intoxicação em uma granja localizada no Município de Águas de Chapéu, Santa Catarina, onde suínos ingeriram milho contaminado, levando à mortalidade de aproximadamente 400 animais. Barros et al. (1990) descrevem um surto nos municípios de Alegrete e Quaraí, Rio Grande do Sul, no qual morreram acima de 30 bovinos e talvez também 8 eqüinos pela ingestão de sorgo contaminado com sementes de *S. occidentalis*. Isso enfatiza a importância de adoção de medidas para o controle da planta como invasora

de cereais destinados à alimentação animal. A colheita mecânica de cereais como o milho e o sorgo, introduz riscos importantes para a ocorrência da intoxicação, já que este método favorece a contaminação dos grãos por sementes desta planta. Esses riscos são maiores com o uso do sorgo, uma vez que esse grão apresenta semelhanças de tamanho e de densidade com as sementes de *S. occidentalis* (Colvin et al. 1986). Esse cereal vem sendo bastante utilizado no Brasil como substituto de outros grãos, principalmente para alimentação de suínos e bovinos (Barros et al. 1990).

REFERÊNCIAS

- Barros C.S.L., Pilati C., Andujar M.B., Graça D.L., Irigoyen L.F., Lopes S.T. & Santos C.F. 1990. Intoxicação por *Cassia occidentalis* (Leg. Caes.) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 10 (3/4):47-58.
- Beçak W. & Paulete J. 1976. *Técnicas de Citologia e Histologia*. Vol. 2. Livros Técnicos Editora, Rio de Janeiro.
- Blondheim S.H., Margolia E. & Shafir E. 1958. A simple test for myohemoglobinuria (myoglobin). *J. Am. Med. Assoc.* 167:453-454.
- Blood D.C. & Radostits O.M. 1989. *Veterinary Medicine*. 7th ed. Bailliere Tindall, London.
- Brocq-Rousseau & Bruere P. 1925. Accidents mortels sur des chevaux a la graine de *Cassia occidentalis* L. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 92:555-557.
- Butolo J.E., Torres W.L.N., Nakano M., Saliba A.M., Grechi R., Bottino J.A. & Yeseu T. 1972. Intoxication in layers (*Gallus gallus domesticus*) caused by *Cassia occidentalis* L. *Anais Congr. Mundial Alimentación Animal*, Madrid, vol. 5, p. 647-653.
- Colvin B.M., Harrison L.R., Sangster L.T. & Gosser H.S. 1986. *Cassia occidentalis* toxicosis in growing pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189:423-426.
- Dollahite J.W., Henson J.B. & Householder G.T. 1964. Coffee senna (*Cassia occidentalis*) poisoning in animals. *Tex. Agric. Exp. Stn. Progr. Rep.* 2318, Texas A. & M. University, 2p.
- Dollahite J.W. & Henson J.B. 1965. Toxic plants as the etiologic agent of myopathies in animals. *Am. J. Vet. Res.* 26:749-752.
- El Sayed N.Y., Abdelbari E.M., Mahmoud O.M. & Adam S.E.I. 1983. The toxicity of *Cassia occidentalis* to nubian goats. *Vet. Quart.* 5:80-85.
- Graziano M.J., Flory W., Seger C.L. & Herbert C.D. 1983. Effects of a *Cassia occidentalis* extract in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Am. J. Vet. Res.* 44:1238-1244.
- Henson J.B., Dollahite J.W., Bridges C.H. & Roa R.R. 1965. Myodegeneration in cattle grazing *Cassia* species. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 147:142-145.
- Henson J.B. & Dollahite J.W. 1966. Toxic myodegeneration in calves produced by experimental *Cassia occidentalis* intoxication. *Am. J. Vet. Res.* 27:947-949.
- Herbert C.D., Flory W., Seger C. & Blanchard R.E. 1983. Preliminary isolation of a myodegenerative toxic principle from *Cassia occidentalis*. *Am. Vet. Res.* 44:1370-1374.
- Irigoyen L.F., Graça D.L. & Barros C.S.L. 1991. Intoxicação experimental por *Cassia occidentalis* (Leg. Caes.) em eqüinos. *Pesq. Vet. Bras.* 11(1/2):35-44.
- Jones T.C. & Hunt R.D. 1983. *Veterinary Pathology*. 5th ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Kelly R.W. 1985. The liver and biliary system, p. 239-312. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed.) *Pathology of Domestic Animals*, vol 2. 3rd ed. Academic Press, Orlando.
- Leman D.C., Straw B., Glock W.L., Pemy R.H.C. & Schol E. 1986. *Diseases of Swine*. 6th ed. Iowa State University Press.
- Machado E.G. 1983. Efeito da presença de sementes de fedegoso (*Cassia occidentalis* L.) como impureza na alimentação de frangos de corte. *Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Univ. São Paulo*. 94p.
- Martin B.W., Terry M.K., Bridges C.H. & Bailey E.M. 1981. Toxicity of *Cassia occidentalis* in the horse. *Vet. Hum. Toxicol.* 23:416-417.
- Martins E., Martins V.M.V., Riet-Correa F., Soncini R.A. & Paraboni S.V. 1986. Intoxicação por *Cassia occidentalis* (Leguminosae) em suínos. *Pesq. Vet. Bras.* 6(2):35-38.
- McGavin M.D. 1988. Muscular system, p. 345-367. In: Thomson R.G. (ed.) *Special Veterinary Pathology*. B.C. Decker, Philadelphia.
- Mercer H.D., Neal F.C., Himes J.A. & Edds G.T. 1967. *Cassia occidentalis* toxicosis in cattle. *J. Am. Vet. Assoc.* 151:735-741.
- Miller D.J.S., O'Connor J.J. & Roberts N.L. 1986. Tiamulin/salinomycin interactions in pigs. *Vet. Rec.* 118:73-75.
- Moussu R. 1925. L'intoxication par les grains de *Cassia occidentalis* L. est due a une toxalbumine. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 92:862-863.
- National Research Council 1988. *Nutrients Requirements of Swine*. National Academy of Sciences, Washington, D.C. 52p.
- O'Hara P.J., Pierce K.R. & Read W.K. 1969. Degenerative myopathy associated with ingestion of *Cassia occidentalis* L.: clinical and pathologic features of experimentally induced disease. *Am. J. Vet. Res.* 30:2173-2180.
- O'Hara P.J., Pierce K.R. & Read W.K. 1970. Effects of vitamin E and selenium on *Cassia occidentalis* intoxication in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 31:2151-2156.
- O'Hara P.J. & Pierce K.R. 1974a. A toxic cardiomyopathy caused by *Cassia occidentalis*. I. Morphologic studies in poisoned rabbits. *Vet. Path.* 11:97-109.
- O'Hara P.J. & Pierce K.R. 1974b. A toxic cardiomyopathy caused by *Cassia occidentalis*. II. Biochemical studies in poisoned rabbits. *Vet. Path.* 11:110-124.
- Rogers R.J., Gibson J. & Reichmann K.G. 1979. The toxicity of *Cassia occidentalis* for cattle. *Aust. Vet. J.* 55:408-412.
- Rubin E. & Farber J.L. 1990. Fígado e vias biliares, p. 640-713. In: *Patologia*. Interlivros, Rio de Janeiro.
- Santos M.N. 1987. Técnica para demonstração de gordura, p. 34-38. In: *Histoquímica*. Depto Patologia, UFSM, Santa Maria, RS.
- SAS Institute Inc. 1985. *User's Guide: Statistics*, Version. 5th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Schmitz D.G. & Denton J.H. 1977. Senna bean toxicity in cattle. *Southwestern Vet.* 30:165-170.
- Simensen M.G. 1983. Clinic-pathologic findings in young pigs fed different levels of selenium, vitamin E and antioxidant. *Acta Vet. Scand.* 23:295-308.
- Simpson C.F., Damrom B.L. & Harms R.H. 1971. Toxic myopathy of chicks fed *Cassia occidentalis* seeds. *Avian Dis.* 15:284-290.
- Suliman H.B., Wasfi I.A. & Adam S.E.I. 1982. The toxicity of *Cassia occidentalis* to goats. *Vet. Hum. Toxicol.* 24:326-330.
- Taylor D.C. 1986. *Pig Diseases*. 4th ed. Burlington Press, Cambridge.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1984. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 4(2):39-65.
- Torres W.L.N., Nakano M., Nobre D. & Momose N. 1971. Intoxicação em aves ocasionada por *Cassia occidentalis* L. *Biológico*, S. Paulo, 37 (8):204-208.
- Umemura T., Kawaminami A., Goryo M. & Itakura C. 1985. Enhanced myotoxicity and involvement of both type I and II fibers in monensin-tiamulin toxicosis in pigs. *Vet. Path.* 22(4):401-414.
- Van Vleet J.F., Amstutz H.E., Weirich W.E., Rebar A.H. & Ferrans V.J. 1983. Acute monensin toxicosis in swine: Effect of graded doses of monensin and protection of swine by pretreatment with selenium-vitamin E. *Am. J. Vet. Res.* 44(8):1469-1475.
- Van Vleet J.F. & Ferrans. 1988. Cardiovascular system, p. 143-311. In: Thomson R.G. (ed.) *Special Veterinary Pathology*. B.C. Decker, Philadelphia.

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) EM EQUINOS¹

CARLOS HUBINGER TOKARNIA², ELIZABETH RAMALHO COSTA³, JOSÉ DIOMEDES BARBOSA³, ANIBAL GUILLERMO ARMIÉN⁴ e PAULO VARGAS PEIXOTO⁵

ABSTRACT.- Tokarnia C.H., Costa E.R., Barbosa J.D., Armien A.G. & Peixoto P.V. 1993. [Experimental poisoning of horses by *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae).] Intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em equinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(3/4):67-72. Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro, 23851-970, Brazil.

Fresh leaves of *Palicourea marcgravii* St. Hil., the most important poisonous plant for cattle in Brazil, containing monofluoroacetic acid as its toxic principle, were given orally to 8 horses in doses ranging from 0.15 to 2 g/kg. The lethal dose found was 0.6 to 1.0 g/kg. The symptoms of poisoning by *P. marcgravii* in the horse were characterized mainly by nervous manifestations as intense sweating, restlessness, tremors, abrupt involuntary movements of the head or the whole body, instability, incoordination and flacid lips; less evident were signs of cardiac insufficiency as positive venous pulse, congested conjunctiva and laborious respiration. The clinical course of the poisoning ranged from 10 to 43 hours, different as observed in cattle, in which poisoning by *P. marcgravii* is characterized by sudden death due to an acute cardiac insufficiency. Also contrary to what is seen in cattle, exercise in general had not much influence on the course of the poisoning in the horse. Post-mortem findings in the horse were, as in cattle, practically negative. The most important histological lesions were necrosis of the epithelial cells of the uriniferous tubules with picnosis of the nucleus and vacuolization of the cytoplasm, frequently evolving to lysis; these lesions were more marked and extensive than those observed in cattle. There are no case histories of poisoning in horses by *P. marcgravii* under natural conditions.

INDEX TERMS: Poisonous plants, *Palicourea marcgravii*, Rubiaceae, horse, pathology.

SINOPSE.- As folhas frescas recém-colhidas de *Palicourea marcgravii* St. Hil., a planta tóxica de interesse pecuário mais importante para bovinos no Brasil, e cujo princípio tóxico é o ácido monofluoroacético, foram administradas, por via oral, a 8 equinos, em doses de 0,15 a 2 g/kg. A dose letal encontrada variou de 0,6 a 1 g/kg. O quadro clínico de intoxicação por *P. marcgravii* em equinos foi caracterizado por sintomatologia nervosa como sudorese intensa, inquietação, tremores, movimentos abruptos involuntários da cabeça ou afetando todo o corpo (tiques), instabilidade e incoordenação, lábio inferior flácido, e por sinais de insuficiência cardíaca, como pulso venoso positivo, conjuntivas congestionadas, respiração ofegante, com predominância da sintomatologia nervosa. A evolução foi de 10 a 43 horas, diferente do que é observado em bovinos, nos quais a intoxicação por essa planta é caracterizada por "morte súbita" devido a insuficiência

cardíaca aguda. Ao contrário do que ocorre nos bovinos, em equinos, o exercício, em geral, não tinha muita influência sobre a evolução da intoxicação. Os achados de necropsia foram, como nos bovinos, praticamente negativos. As alterações histológicas mais importantes e constantes foram necrose das células epiteliais dos túbulos uriníferos, caracterizada por picnose nuclear e vacuolização citoplasmática com freqüente evolução para lise, lesão esta bem mais grave e extensa do que a dos bovinos. Não há relatos da intoxicação natural por *P. marcgravii* em equinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, *Palicourea marcgravii*, Rubiaceae, equinos, patologia.

INTRODUÇÃO

Palicourea marcgravii St. Hil. (fam. Rubiaceae), a planta tóxica de interesse pecuário mais importante do Brasil, apresenta distribuição geográfica muito ampla, sendo encontrada em todo o país, com exceção da Região Sul e Mato Grosso do Sul.

Sob condições naturais, a intoxicação por *P. marcgravii* é conhecida praticamente só em bovinos. Experimentalmente, têm sido intoxicados, por via oral, além dos bovinos (Pacheco & Carneiro 1932, Döbereiner & Tokarnia 1959, Costa et al. 1984, Tokarnia & Döbereiner 1986),

¹ Aceito para publicação em 14 de janeiro de 1993.

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

³ Médico Veterinário do Instituto de Veterinária, Setor de Grandes Animais, UFRRJ.

⁴ Médico Veterinário, bolsista da FAPERJ, Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Seropédica, RJ 23851-970.

⁵ Depto Epidemiologia e Saúde Pública, Setor de Anatomia Patológica, UFRRJ; bolsista do CNPq (302342/86-9).

também ovinos (Tokarnia et al. 1986), caprinos (Tokarnia et al. 1993), coelhos (Peixoto et al. 1987), cobaias (Pacheco & Carneiro 1932) e ratos (Pacheco & Carneiro 1932).

Em relação aos eqüinos, não há relatos da intoxicação natural. Pacheco & Carneiro (1932) realizaram os únicos experimentos com *P. marcgravii* nessa espécie animal, utilizando extrato aquoso de folhas dessecadas, obtido por trituração e filtração em gaze. Este extrato foi administrado "pela garrafa", com exceção de uma série experimental, em que a aplicação da planta foi feita por via endovenosa. Um eqüino, com peso de 416 quilos, recebeu 100 g da planta e não mostrando nada de anormal, 4 dias depois, mais 200 g da planta. Dois meses depois, morreu de "osteomalacia", doença que o afligia já no começo do experimento. Um outro eqüino, com peso de 470 quilos, recebeu em uma 1ª série, no 1º dia, 300 g, no 2º dia, 100 g e no 3º dia, 400 g da planta. Observado durante 2 meses, o animal "não parecia incomodado". Numa 2ª série, o mesmo animal recebeu (2 meses após o início da 1ª série) 350 g da planta no 1º dia, 175 g no 3º dia e 325 g no 10º dia, num total de 850 g da planta. Durante este período o animal teve emagrecimento rápido, tristeza, prostração, apatia, enfraquecimento geral, pulso filiforme, fraco, irregular, tremores musculares e pulso venoso da jugular. Os autores concluíram que se tratava de intoxicação crônica. Numa 3ª série, aos 15 dias, a contar do início da 2ª série, o animal recebeu extrato aquoso da planta seca em quantidade correspondente a 300 g da planta verde, por via endovenosa, e no 17º dia, mais 270 g "da planta verde" por via endovenosa. O animal mostrou, no 15º dia, polipnéia e dispnéia, pulso acelerado, pulso venoso da jugular, tremores musculares, prostração, desaparecendo os sintomas rapidamente; no 17º dia mostrou transpiração abundante, salivação, fraqueza; no 18º dia, ligeiro edema na região sub-maxilar e morreu nesse mesmo dia. Os achados de necropsia foram "hidropericardite", sendo o pericárdio parietal semeado de potéquias; coração de paredes espessadas, grandemente aumentado de volume, pesando 4.600 g; fígado amarelado, com focos hemorrágicos abundantes, friável, baço hipertrofiado. Com esses experimentos, aqueles autores concluíram que no cavalo a administração de doses fracionadas permitiu realizar uma intoxicação crônica, que o efeito acumulativo da planta persistiu durante 2 meses e que a dose mínima letal para eqüinos foi de aprox. 5 g/kg, 7 vezes maior que para os bovinos.

O presente estudo experimental foi realizado para melhor caracterizar a intoxicação por *P. marcgravii* em eqüinos, em relação à dose letal, ao quadro clínico e aos achados de necropsia, e descrever os achados microscópicos dessa intoxicação.

MATERIAL E MÉTODOS

Os 8 eqüinos usados nos experimentos com *Palicourea marcgravii* St. Hil. eram animais adultos, machos ou fêmeas, pesando entre 345 e 484 kg. Os animais foram mantidos em boxes individuais, com água e capim à vontade.

Em todos os experimentos foi usada a planta (folha e talos tenros) fresca recém-colhida e guardada na geladeira, no máximo até o 4º dia após a coleta, realizada em 18.4.92 e 23.4.92 na Fazenda Todos os Santos, Município de Engenheiro Paulo de Frontin, Estado do Rio de Janeiro. Todos os experimentos consistiram em administrações únicas da planta em dosagens pré-estabelecidas (vide Quadro 1); a planta era colocada na boca do animal, entre a bochecha e os dentes, junto com capim e ração.

Os eqüinos foram examinados antes da administração da planta. Após a administração da mesma, eram observados continuamente e submetidos com frequência a exames clínicos mais detalhados. Duas vezes por dia eram movimentados (postos a correr) durante 15 minutos. Nos casos de morte, procedia-se imediatamente à necropsia. Fragmentos de coração, pulmões, fígado, rins, baço, linfonodos, diversas partes do tubo digestivo e do sistema nervoso central e glândulas de secreção interna, eram coletados em formalina a 10%, incluídos em parafina, cortados em micrótomo e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

Um animal (Eq. 4960) que adoeceu moderadamente, mas se recuperou, foi sacrificado 2 meses após o experimento para verificação de eventuais seqüelas.

RESULTADOS

Os principais dados sobre os animais, doses e prazos relativos aos experimentos constam do Quadro 1. Detalhes sobre sintomas, achados de necropsia e exames histopatológicos são fornecidos nos "resumos dos protocolos" no fim deste capítulo.

Doses administradas

A dose de 1 g/kg da planta fresca causou a morte dos 2 eqüinos; a dose de 0,6 g/kg causou a morte de um eqüino e no outro, causou doença de intensidade moderada. A dose de 0,3 g/kg não causou sintomas de intoxicação em um animal e somente leves sintomas em outro.

Início dos sintomas após administração da planta

Nos animais que morreram, os primeiros sintomas ocorreram entre 2h40min e 6h25min após o início da administração da planta. Já com os 2 animais que adoeceram, mas se recuperaram, esse prazo foi de 18h05min e 23h.

Evolução clínica

Nos experimentos que terminaram com a morte dos animais, sintomas de intoxicação foram observados durante 9h43min a 43h15min. Nos eqüinos que adoeceram, mas se recuperaram, esse período foi de 32h40min e 33h30min.

Sintomas de intoxicação

A sintomatologia apresentada pelos animais intoxicados experimentalmente pelas folhas de *P. marcgravii* foi bastante uniforme. Inicialmente foi observada sudorese intensa, seguida de inquietação, tremores musculares, movimentos abruptos da cabeça e às vezes afetando todo o corpo (tiques), instabilidade (animais afastavam os membros para manter o equilíbrio), lábio inferior flácido;

Equino n. ^o (Reg. SAP)	Administrações		Desfecho	Início dos sintomas após começo da administração	Evolução	Morte após início da administração	Sintomas										
	Peso (kg)	Data da adminis- tração (g/kg)					In- te- que- re- se	In- te- re- m- os	Tre- m- os	Ti- que- res	Insta- bili- dade	Láb- io inf- l- a- do	Pulso veno- so pos.	Conjun- tivas con- ges- tas	Respi- ração ofe- gan- te		
4958 (25710-13)	366	18.4.92	2,0	Morreu	2h40min	9h43min	12h23min	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4959 (25714-17)	345	18.4.92	1,0	Morreu	6h25min	43h15min	49h40min	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4960	386	17.4.92	0,6	Adoeceu moderada- mente	18h05min	(33h30min)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
4961	483	20.4.92	0,3	Sem sinto- mas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4962 (25729-32)	434	24.4.92	1,0	Morreu	4h57min	30h13min	35h10min	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4963 (25725-28)	Aprox. 360	24.4.92	0,6	Morreu	5h59min	14h25min	20h24min	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4964	Aprox. 420	24.4.92	0,3	Adoeceu levemente	23h	(32h40min)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4965	Aprox. 400	27.4.92	0,15	Sem sinto- mas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a + Sintoma manifestado, - Sintoma não manifestado.

quicardia, conjuntivas congestas, taquipnéia, respiração ofegante e exsiccose.

Achados de necropsia

Não foram observadas lesões macroscópicas de relevância ou constantes.

Alterações histológicas

O órgão que apresentou as lesões mais características e acentuadas foi o rim. Em todos os equínos havia necrose das células epiteliais dos túbulos uriníferos, caracterizada por picnose nuclear e vacuolização citoplasmática com freqüente evolução para lise (Fig. 1). Era afetada a gran-

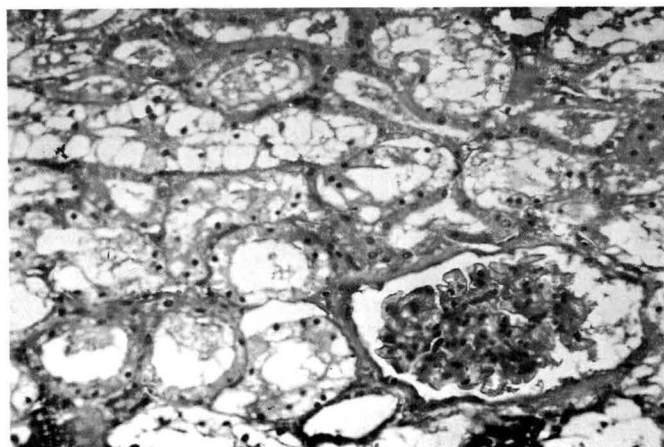


Fig. 1. Necrose das células epiteliais dos túbulos uriníferos; picnose nuclear; vacuolização citoplasmática com evolução para lise (Eq. 4962, SAP 25729), HE, obj. 16.

de maioria das células epiteliais de todos os túbulos do nefron, tanto no córtex como na medula - com exceção dos túbulos coletores. Os espaços de Bowman estavam bem dilatados e continham material protéico filtrado. No fígado foi observada, em todos os animais, degeneração turva com intensidade leve (Eq. 4962) ou moderada (Eq. 4958, 4959, 4963), afetando principalmente as zonas central e intermediária do lóbulo, havendo ainda vacuolização areal de intensidade leve, principalmente na zona intermediária (Eq. 4959) ou leve difusa (Eq. 4963); em um animal (Eq. 4962) havia leve congestão centrolobular em alguns lóbulos acompanhado de leve edema dos espaços de Disse. No miocárdio de 2 animais (Eq. 4958 e 4962) foi observada pequena quantidade de fibras (em pequenos focos ou fibras individuais) com citoplasma homogêneo, mais eosinófilo e núcleo picnótico (necrose incipiente) e ainda tumefação e vacuolização de células isoladas, lesões estas de intensidade leve no Eq. 4959 e de leve a moderada no Eq. 4962. Em 2 animais (Eq. 4959 e 4962) foram verificadas lesões na mucosa do estômago; no Eq. 4959 moderada tumefação e vacuolização difusa afetando principalmente as células principais e necrose de coagulação das células parietais com seu despreendimento para a luz glandular, lesão esta de intensidade leve; no

quando movimentados, os animais corriam bem, a não ser quando a instabilidade era muito grande; somente um animal (Eq. 4963) caiu durante o exercício e logo morreu. Foram observados, ainda, pulso venoso positivo, ta-

Eq. 4962 grande número de glândulas da mucosa estava dilatada e preenchida por numerosos polimorfonucleares, parcialmente degenerados (lesão de intensidade moderada); havia discreta tumefação com evolução para lise das células principais, e necrose em grau leve das células parietais com seu desprendimento para a luz glandular.

Resumo dos protocolos

Eqüino 4958, macho castrado, mestiço, com 20 anos de idade, 366 kg, recebeu em 18.4.92, das 10:15 às 11:15h, 740 g (2 g/kg) das folhas frescas de *P. marcgravii* coletadas em 16.4.92 na Faz. Todos os Santos, Mun. Eng. Paulo de Frontin, RJ. Antes da administração da planta T 37,0⁶, FC 40, FR 22. Às 12:55h foi observada intensa sudorese e inquietação; às 13:05 sudorese, apetite mantido; às 13:10 acentuado pulso venoso positivo, excicose; às 13:23 novamente intensa sudorese. Às 13:28 levado ao piquete, começou logo a pastar; fortes tremores musculares na coxa, membros posteriores bem afastados. Às 13:55h ameaçou deitar por diversas vezes; moderados a fortes tremores musculares. Às 14:05 deitou, ficou em decúbito lateral, logo em seguida ficou meio sentado; lábio inferior flácido, T 35,8, FC 60. Às 14:28 foi tangido e levantou logo, foi comer. Das 14:32 às 14:37h, tangido, corria bem; às 14:43h tremores na região da escápula. Às 15:17h deitou novamente ficando em decúbito lateral, depois em decúbito esternal com a cabeça apoiada no chão e com os membros anteriores dobrados. Às 15:22h, T 36,4. Às 15:55h levantou e foi pastar. Às 17:00h em decúbito esternal, contrações clônicas em todo o corpo, logo em seguida em decúbito lateral. Às 17:04h em decúbito esternal com contrações clônicas sacudindo todo o corpo; às 17:05h levantou, não se alimentou mais; moderados tremores nos membros anteriores; deitou meio caindo e ficou em decúbito lateral. Às 17:11h, quando movimentado, levantou; continuaram as contrações clônicas; membros rígidos. Às 17:25h em decúbito esternal, com sudorese intensa, gemia, respiração superficial, entrecortada; T 36,0. Às 17:30h respiração difícil com gemidos, mastigação vazia; ora em decúbito lateral, ora esternal. Às 17:35h em decúbito esternal, tangido, só conseguiu levantar e caminhar com bastante dificuldade; priapismo, mioclonias mais fortes e generalizadas, bem como movimentos abruptos (tiques) da cabeça. Às 17:40h ficou em decúbito esternal e logo em seguida lateral, sudorese profusa, respiração difícil com gemidos. Às 17:43h, forçado a se levantar, ficou com a cabeça apoiada contra a parede. Às 17:52h com acentuada incoordenação; ao tentar deitar-se com mioclonias generalizadas, ficou ajoelhado, mas não conseguiu deitar-se. Às 17:55h com fortes tiques da cabeça, mioclonias generalizadas, flacidez dos lábios, respiração ofegante, jugular repleta; às 18:10h tremores generalizados, FC 92, FR 64, em estação, com os membros aproximados, pescoço estendido, cabeça baixa. Às 18:18h fez uma volta no box com grande dificuldade, parecia estar cego. Entre às 18:09 e 22:19h urinou 8 vezes, sempre em grande quantidade; às 18:30h tremores generalizados, com movimentos abruptos ocasionais de todo o corpo; FR 68, respiração ofegante; todos os vasos da pele salientes. Excicose acentuada. Às 18:50h muita instabilidade, apoiado na parede; às 18:55h pulso imperceptível, T 37,2, FC 80, FR 68. Às 19:00h mastigação vazia, mucosas (conjuntiva e oral) bem congestionadas. Às 19:44h tremores muito acentuados, deu umas voltas na baía, andar incoordenado. Às 19:45h ameaçou deitar, ficou com a cabeça encostada contra a parede, pisando no mesmo local; tremores generalizados fortes; às vezes movimentos abruptos involuntários (tiques) de todo o corpo. Às 20:13h quase caiu, fortes tremores, respiração ofegante, ruidosa, FR 80. Às 20:55h mais calmo. Às 21:27h T 37,2, FC 92, FR 88. Às 21:35h espirros fortes; às 21:37h cabeça baixa, membros afastados. Às 22:20h balançava, batia de vez em quando com a cabeça contra a parede, tremores cada vez mais fortes; às 22:26h deitou em decúbito esternal, com a cabeça virada para o lado. Inclina-se frequentemente para o lado, mas voltava sempre à posição inicial. Às 22:30h deitou de lado; às 22:32h parada cardíaca, respiração ofegante, movimentos de pedalagem violentos, gemidos; às 22:38h último movimento respiratório. — Achados de necropsia: epicárdio com sufusões leves, conteúdo estomacal ressequido.

Eqüino 4959, macho castrado, mestiço, com 22 anos de idade, 345 kg, recebeu em 18.4.92, das 15:35 às 16:50h, 345 g (1 g/kg) das folhas frescas de *P. marcgravii*, coletadas em 16.4.92 na Fazenda Todos os Santos, Mun. Eng. Paulo de Frontin, RJ. Antes da administração da planta, T 37,0, FC 38, FR 20. Às 22:00h foi observada sudorese; apetite mantido. Em 19.4.92 às 00:10h pulso venoso positivo, batimentos cardíacos fortes, conjuntiva congesta; dispnéia mista; forte sudorese na cabeça. Às 7:35h tremores na escápula; mastigação vazia; oferecido capim, comia bem. Às 8:30h, quando

puxado para fora do box, teve andar rígido com os membros posteriores muito afastados; tremores em todo o corpo e hiperestesia cutânea; T 37,3, FC 108, FR 64. Das 9:30 às 9:45h, foi movimentado; no minuto inicial, corria levantando muito os membros, depois normalmente. Às 11:00h sudorese profusa; às 11:05h com tiques da cabeça, depois afetando todo o corpo; balançava o trem posterior; espirros diversos. Às 12:32h batia com os cascos no chão; às 12:42h com mastigação vazia, jugular saliente, pulso venoso positivo, lábios relaxados. Às 13:34h mastigação vazia, espirros. Às 14:40h imóvel, com os membros posteriores afastados e um pouco flexionados, cabeça baixa. Às 17:23h apático; à movimentação, trotou por 5 minutos e parou; respiração ofegante; com mioclonias, pulso venoso positivo, andar desequilibrado, sudorese, hiperestesia cutânea, flacidez dos lábios, membros posteriores afastados, tiques da cabeça. Piorou muito depois do exercício. Às 18:15h, ao ser colocado no box, só andou puxado, com os membros posteriores afastados; tremores generalizados a ponto do corpo balançar, às vezes com tiques afetando todo o corpo; conjuntiva congesta, lacrimejamento. Às 19:00h forte sudorese, tremores generalizados, contrações abruptas. Às 20:16h rangia os dentes. Em 20.4.92, às 00:04h, animal em estação com os membros posteriores bem afastados, apoiado na parede, sonolento. Às 5:20h em pé, batendo com a pata anterior no chão como se estivesse cavando, membros posteriores bem afastados, tremores musculares, frequentes tiques afetando todo o corpo, sudorese, hiperestesia cutânea. Às 5:30h irrequieto, movimentos de mastigação vazios. Às 6:50h sudorese intensa, inquietação, tremores musculares fortes, lábios relaxados. Até às 10:55h mostrava a mesma sintomatologia. Às 10:55h respiração estertorosa, FR 20, FC 108, mucosas cianóticas. Às 11:20h respiração muito ruidosa, balançava o corpo cada vez mais; leves tremores, membros posteriores afastados, pulso venoso positivo. Às 12:21h pisava no mesmo local; espirros. Às 12:30h respiração ofegante. Às 15:00h respiração ruidosa, FR 32, mucosa oral cianótica. Às 16:48h em estação, com os membros posteriores afastados, pulso venoso positivo, cabeça baixa; ao ser ajudado para mudar de lugar, apresentou desequilíbrio, chocando-se em obstáculos (cegueira) e caiu em decúbito lateral, não conseguindo mais se levantar, apesar de várias tentativas, sempre caindo violentamente ao chão. Às 17:10h movimentos de pedalagem bruscos, mucosa oral pálida, gemidos. Às 17:15h morte. — Achados de necropsia: epicárdio do ventrículo esquerdo com leves sufusões. Estômago com conteúdo ressequido e mucosa difusa e moderadamente avermelhada. Mucosa do duodeno levemente avermelhada. Parte final do jejuno com bastante líquido.

Eqüino 4960, macho castrado, mestiço com 18 a 20 anos, 386 kg, recebeu em 17.4.92, das 18:00 às 18:45h, 232 g (0,6 g/kg) das folhas frescas de *P. marcgravii* coletadas em 16.4.92 na Faz. Todos os Santos, Mun. Eng. Paulo de Frontin, RJ. Antes da administração da planta, T 37,6, FC 40, FR 20. Em 18.4.92 o animal foi movimentado das 9:07 às 9:22h e correu bem sem mostrar sintomas. Logo depois pastou normalmente. Às 12:05h parado com os membros posteriores afastados; tangido, com andar rígido, hiperestesia. FC 60, FR 36. Das 12:12 às 12:18h, movimentado, correu bem. Às 12:28h, às vezes tiques da cabeça. Às 12:42h imóvel, tremores generalizados fortes, membros posteriores afastados, instabilidade acentuada. Às 12:51h seqüência de tiques com balanço da cabeça; apetite mantido. Às 12:56h contrações abruptas fortes. Às 13:00h com leve sudorese, pulso venoso positivo forte. Às 13:10h fortes tremores generalizados, quase caiu. Excicose moderada. Às 14:17h, movimentado, no início andava com dificuldade, depois correu bem durante uns 8 minutos. Às 14:50h deitou em decúbito lateral, depois esternal, tiques da cabeça. Às 15:10h levantou, membros posteriores afastados, sudorese. Às 20:15h irrequieto, batia com os cascos no chão, andava em círculos na baía. Às 20:45h T 37,0, FC 52, FR 32, conjuntiva congesta. Às 21:20h irrequieto, andar em círculos. Em 19.4.92 às 5:40h T 37,5, FC 68, FR 20, solto no pasto, comia com certa avidez, pulso venoso positivo. Às 12:30h espirros sucessivos. Às 13:20h com membros posteriores afastados. Às 18:50h com sudorese. Às 19:35 e às 21:30h, às vezes leves tiques da cabeça. Depois não mais mostrou sintomas de intoxicação.

Eqüino 4962, macho castrado mestiço, com 18 a 20 anos de idade, 434 kg, recebeu em 24.4.92, das 10:28 às 10:52h 434 g (1 g/kg) das folhas frescas de *P. marcgravii*, coletadas em 23.4.92 na Faz. Todos os Santos, Mun. Eng. Paulo de Frontin, RJ. Antes da administração da planta, T 37,5, FC 40, FR 28. Às 15:25h com intensa sudorese; apetite caprichoso. Às 18:45h tiques da cabeça. Às 19:05 mastigação vazia. Às 20:05h com a cabeça baixa, apático, pulso venoso positivo. Às 20:40h T 37,3, FC 96, FR 20, membros posteriores um pouco afastados, tremores na cabeça, leve incoordenação. Às 21:05h tremores nas regiões escapular e glútea, desequilíbrio, tremores generalizados, mastigação vazia. Às 21:25h, quando se fazia ruidos (bater palmas), reagia com tremores musculares e desequilíbrio. Às 21:40h, acesso de tremores e, por vezes, desequilíbrio, membros posteriores afastados. Às 21:53h, diminuição da sensibilidade periférica, os 4 membros afastados, tremores mais fortes, às vezes balançava o corpo todo. Em 25.4.92, às

⁶ T = Temperatura em grau Celso, FC = frequência cardíaca (batimentos por minuto), FR = frequência respiratória (movimentos por minuto).

2:40h, membros afastados, mudava de lugar com dificuldade, tremores da cabeça, conjuntiva congesta; FC 100, FR 44. Às 8:00h em pé, tranqüilo. Comeu um pouco. Animal imóvel com os 4 membros afastados; ptose palpebral. Das 10:15 às 10:29h, quando movimentado, correu bem, suando e bufando. Às 11:11h, sempre em pé na mesma postura, com a cabeça baixa, membros afastados, pulso venoso positivo, gemidos, tremores na cabeça, leve sudorese. Às 13:40h apático, cabeça baixa, respiração ofegante, pulso venoso positivo, lábios relaxados, sudorese. Às 14:50h irrequieto, movimentos respiratórios fortes e ofegantes. Às 17:30h apático. Das 17:40 às 17:45h, quando movimentado, teve andar desequilibrado, respiração ofegante; logo em seguida ficou parado com os membros afastados. Às 17:59h imóvel, cabeça baixa, lábios relaxados, membros afastados. Às 18:23h andar inseguro. Às 20:05h com dispnéia. Às 20:20h irrequieto, com respiração muito ofegante, tremores musculares nos membros anteriores; às 20:31h com a cabeça encostada na parede. Às 20:39h, tremores em todo o corpo, respiração muito ofegante, cabeça baixa, membros posteriores afastados. Às 21:04h FC 112, FR 52 abdominal, mucosa ocular congesta. Às 21:21h, narinas dilatadas. Às 21:25h, instabilidade. Às 21:31h, tremores generalizados, respiração muito ofegante; cabeça encostada na parede, com os membros muito afastados. Às 21:35h caiu ao chão, ficando em decúbito lateral, debatia-se intensamente. Às 21:36h, parada cardíaca, às 21:38, parada respiratória. — Achados de necropsia: Estômago com conteúdo fermentado (com cheiro de silagem) e mucosa leve e difusamente congesta. Duodeno com mucosa leve e difusamente congesta. Fígado na superfície e ao corte com aspecto de noz-moscada.

Equino 4963, macho castrado, mestiço, com 18 anos de idade, aprox. 360 kg, recebeu em 24.4.92, das 11:20 às 11:40h e das 14:08 às 14:45h 220 g (06 g/kg) das folhas frescas de *P. marcgravii* coletadas em 23.4.92 na Faz. Todos os Santos, Mun. Eng^o Paulo de Frontin, RJ. Antes da administração da planta, T 37,0, FC 44, FR 32. Às 20:07 intensa sudorese na região ventral, no pescoço e na cabeça; apetite mantido. Em 25.4.92 às 2:50h T 37,3, FC 60, FR 28. Às 8:25h, crise de fortes tremores generalizados, acentuada falta de equilíbrio, respiração acentuadamente ofegante. Às 8:29h sem tremores, respiração menos ofegante; T 37,2, FC 92, FR 32, pulso venoso positivo. Às 8:35h, crise de sudorese, mucosa ocular congesta. Tangido, não saía do lugar. Às 10:00h continuava a sudorese forte. Apetite mantido. Às 10:15h, à movimentação, corria levantando muito os membros, com andar preso; lábio inferior flácido. Às 10:19h caiu, esticou os membros, respiração espaçada, relinchou uma vez, respiração difícil. Às 10:30h, parada cardíaca e respiratória; às 10:32h mais um movimento respiratório, morto. — Achados de necropsia: na superfície e ao corte do pulmão, grande quantidade de petéquias.

Equino 4964, macho castrado, mestiço, com 18 a 20 anos de idade, aprox., 420 kg, recebeu em 24.4.92, das 10:00 às 10:10h, 130 g (0,3 g/kg) das folhas frescas de *P. marcgravii* coletadas em 23.4.92 na Faz. Todos os Santos, Mun. Eng^o Paulo de Frontin, RJ. Antes da administração da planta, T 37,8, FC 44, FR 36. Em 25.4.92, às 9:00h, apresentou movimentos abruptos (tiques) da cabeça; às 9:15h essas contrações eram mais fortes. Às 10:00h, novamente tiques da cabeça. Às 10:20h sudorese. Às 11:17h sudorese, movimentos de mastigação vazios; tremores da cabeça, levemente apático; às vezes tremores generalizados. Às 14:00h sudorese intensa, ranger de dentes, pulso venoso positivo; tiques leves da cabeça. Das 17:40 às 17:45h, tangido, não apresentou sintomas. Às 20:15h sudorese, pulso venoso positivo, leves tremores da cabeça, às vezes tremores generalizados. Em 26.4.92, às 00:24h, com leves tremores dos lábios; T 37,2, FC 68, FR 32. Às 7:20h com intensa sudorese. Apetite mantido. Às 16:20h com movimentos abruptos da cabeça (tiques). Às 17:40h, tiques da cabeça. Depois não mostrou mais sintomas de intoxicação.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

É bem conhecido que o princípio tóxico de *P. marcgravii*, o ácido monofluoroacético, interfere no ciclo energético das células, com efeitos graves sobre a função cardíaca e o sistema nervoso central. Dependendo da espécie animal, predominam sintomas nervosos ou cardíacos (Allcroft & Jones 1969, Hall 1972, Robinson & Maxie 1985). Através de experimentos realizados com a aplicação parenteral de fluoroacetato de metila, Chenoweth & Gilman (1946) verificaram que em coelhos, caprinos e equínos o

fluoroacetato afetou principalmente o coração, em gatos e porcos o coração e sistema nervoso central e, em cães e cobaias, somente o sistema nervoso central.

Em nossos experimentos com *P. marcgravii* em equínos houve sintomas nervosos e sinais de insuficiência cardíaca, com predomínio dos primeiros. Desta maneira, a sintomatologia da intoxicação por *P. marcgravii* em equínos diverge da observada por Chenoweth & Gilman (1946) na intoxicação por fluoroacetato de metila na mesma espécie e também é diferente da intoxicação por *P. marcgravii* em bovinos, determinada por insuficiência cardíaca aguda e caracterizada por "morte súbita". Nessa síndrome, os bovinos, aparentemente sadios, sobretudo quando movimentados, subitamente caem ao chão e morrem em questão de minutos, fazendo violentos movimentos de pedalagem; antes de cair, pode-se notar, às vezes, tremores musculares passageiros, freqüentes defecações e micções e pulso venoso positivo (Tokarnia & Döbereiner 1986). A evolução da intoxicação no equino é mais longa, de algumas horas, e os sinais clínicos, uma vez manifestados, mostram-se constantemente evidentes e progredem até a morte do animal. Ainda mais, no bovino a manifestação de sintomas e a morte podem ser precipitados ou provocados por exercício; nos equínos somente em um animal a morte foi precipitada por exercício, mas mesmo esse animal antes já mostrara outros sintomas; nos outros equínos, o exercício não teve qualquer efeito aparente sobre a evolução da intoxicação.

Em ovinos e caprinos, a sintomatologia da intoxicação experimental por *P. marcgravii* foi semelhante à observada em bovinos; os sintomas de intoxicação e a morte dos animais foram observados, na grande maioria dos casos, após exercício; a única diferença foi que em caprinos a evolução variou de 1 minuto a 2 dias, portanto, de uma maneira geral, foi mais longa que em bovinos e ovinos (Tokarnia & Döbereiner 1986, Tokarnia et al. 1986, 1991). Em coelhos, a intoxicação experimental por *P. marcgravii* se caracterizou pelo repentino aparecimento dos sintomas, sem qualquer movimentação ou excitação; os animais subitamente faziam movimentos desordenados e geralmente violentos, seguidos de respiração ofegante e espaçada e morriam; a evolução foi superaguda, na grande maioria dos animais variando de 1 a 5 minutos (Peixoto et al. 1987).

Os achados de necropsia nos experimentos com *P. marcgravii* em bovinos, ovinos, caprinos e coelhos foram praticamente negativos, bem como nos equínos na presente experimentação; porém, os exames histológicos revelaram nessas mesmas espécies, com exceção dos caprinos, em parte dos animais, presença de lesão bastante característica no rim sob forma de degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos túbulos contornados distais; esta revelava-se por aumento de volume celular, citoplasma bastante rarefeito, quase imperceptível e por acentuada picnose nuclear; em alguns desses túbulos a lesão evoluiu à lise. Não sabemos como essa lesão se relaciona com o quadro clínico, porém é possível que ela

ocorra pela eliminação da toxina ou seus metabólitos pelo rim (Tokarnia et al. 1990).

Nos experimentos com a planta fresca em bovinos, doses únicas, essa lesão renal foi observada em 66,6% dos casos (18/27), em ovinos, também nos experimentos de doses únicas, em 50% dos casos (2/4), em caprinos, em nenhum caso. Nos experimentos com a planta dessecada em bovinos, doses únicas, essa lesão não foi vista em nenhum caso (0/4), nos de doses repetidas em 66,6% dos casos (2/3), nos ovinos, nos experimentos de doses únicas, em nenhum caso (0/2), nos de doses repetidas em 9% dos casos (1/11) e em coelhos, nos experimentos de doses únicas, em 12% dos casos (14/116), indicando que nos experimentos com a planta dessecada a lesão renal em questão, incide com menor frequência. (Tokarnia & Döbereiner 1986, Tokarnia et al. 1986, 1991, Peixoto et al. 1987).

Nos eqüinos da presente experimentação, a lesão renal ocorreu em todos os animais (4/4), sendo bem mais grave (necrose) e afetava todas as células epiteliais de todos os túbulos do néfron.

Lesões cardíacas e hepáticas leves, de natureza circulatória e regressiva, semelhantes às encontradas nos eqüinos também foram verificadas na intoxicação experimental por *P. marcgravii* em bovinos, ovinos e caprinos (Tokarnia & Döbereiner 1986, Tokarnia et al. 1986, 1991); no fígado dos coelhos havia lesões do mesmo tipo, porém bem mais acentuadas ocorrendo até mesmo necrose (Peixoto 1987). As lesões do estômago encontradas em 2 dos nossos eqüinos talvez não estejam ligadas diretamente a ação tóxica da planta. Não foram encontradas alterações morfológicas no sistema nervoso central atribuíveis à ação da planta ou que pudessem ser associadas com a sintomatologia de origem nervosa. Havia apenas alterações relacionadas à senilidade.

Podemos concluir que os eqüinos são tão sensíveis como os bovinos à intoxicação por *P. marcgravii* (dose letal entre 0,6 e 1 g/kg), que porém, ao contrário dos bovinos, no quadro clínico demonstrado por eles, predominam sintomas nervosos. As alterações do rim, órgão que apresenta as alterações histológicas mais característi-

cas em bovinos, ovinos e coelhos, também ocorrem em eqüinos, só que neles são mais constantes, graves e extensas.

É difícil discutir os resultados dos experimentos realizados por Pacheco & Carneiro (1932) em eqüinos, devido à metodologia empregada. Não podemos concordar com sua conclusão final, que a dose mínima letal para eqüinos é de apróx. 5 g/kg, 7 vezes maior do que para os bovinos.

REFERÊNCIAS

- Allcroft R. & Jones J.S.L. 1969. Fluoroacetamide poisoning. *Vet. Rec.* 84(16):399-402.
- Chenoweth M.B. & Gilman A. 1946. Studies on the pharmacology of fluoroacetate. I. Species response to fluoroacetate. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 87:90-103.
- Costa M.V., Nascimento E.F., Pessoa J.M. & Costa W.R. 1984. Lesões em bovinos intoxicados pela *Palicourea marcgravii* St. Hil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 36(5):571-580.
- Döbereiner J. & Tokarnia C.H. 1959. Intoxicação de bovinos pela "erva de rato" (*Palicourea marcgravii* St. Hil.) no vale do Itapicuru, Maranhão. *Arqs Inst. Biol. Anim., Rio de J.,* 2:83-91.
- Hall R.J. 1972. Distribution of organic fluorine in some toxic tropical plants. *New Phytol.* 71:855-871.
- Pacheco G. & Carneiro V. 1932. Estudos experimentais sobre plantas tóxicas. 1. Intoxicação dos animais pela "herva de rato da mata" *Palicourea marcgravii* St. Hil. (*Psychotria marcgravii* Spreng.). *Revta Soc. Paulista Med. Vet.* 2(2-3):23-46.
- Peixoto P.V., Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Peixoto C.S. 1987. Intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 7(4):117-129.
- Robinson W.F. & Maxie M.G. 1985. The cardiovascular system, p. 1-81. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed.) *Pathology of Domestic Animals*, vol. 3, 3rd ed. Academic Press, Orlando. (Fluoroacetate Poisoning, p. 22.)
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1986. Intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em bovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 6(3):73-92.
- Tokarnia C.H., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 1986. Intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 6(4):121-131.
- Tokarnia C.H., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 1990. Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 10(1/2):1-10.
- Tokarnia C.H., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 1991. Intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.* 11(3/4):65-70.

BOTULISMO EXPERIMENTAL EM CAPRINOS PELA TOXINA TIPO C¹

LILIAN B. SANTOS², JOSÉ R. MINEO², DEISE A. OLIVEIRA SILVA², MARIA A. SOUZA², HUMBERTO E. COELHO³, ERNESTO A. TAKETOMI², ANDRÉ L.M. CARDOSO² e MARCO A. METIDIERI²

ABSTRACT.- Santos L.B., Mineo J.R., Silva D.A.O., Souza M.A., Coelho H.E., Taketomi E.A., Cardoso A.L.M. & Metidieri M.A. 1993. [Experimental type C botulism in goats.] Botulismo experimental em caprinos pela toxina tipo C. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(3/4):73-76. Laboratório de Imunologia, Depto Patologia, Univ. Fed. Uberlândia, C.P. 593, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil.

The present paper describes the subcutaneous inoculation of goats with botulinum toxin type C to determine the doses required to cause various clinical signs, and to evaluate the bioassay as a means of laboratory confirmation of the diagnosis of botulism. Serial double dilutions in doses ranging from 15.6 to 500 DL50/kg were administered to 6 goats. The animals were checked daily to observe development of characteristic signs. Blood and liver samples were collected to detect the toxin by bioassay in mice. Doses of 500 and 250 DL50/kg induced acute botulism, death occurring between 42 and 46 hours post-inoculation, but the toxin was only detected in serum samples taken from the goat which received the larger dose. Animals inoculated with doses of 125, 62.5 and 31.3 DL50/kg developed the sub-acute form, but the toxin could not be detected in their blood serum. The chronic form of botulism was observed in those which received 15.6 DL50/kg doses and the toxin could not be demonstrated either in their serum samples. The results confirm that goats are highly susceptible to botulinum type C toxin and that these animals develop the same clinical signs as seen in bovines.

INDEX TERMS: Experimental botulism, goats, botulinum type C toxin, clinical signs, bioassay in mice.

SINOPSE.- O objetivo do presente trabalho foi reproduzir o botulismo em caprinos, induzido pela toxina tipo C e determinar as doses para desenvolver as diferentes formas clínicas, bem como para avaliar a eficácia do bioensaio em camundongos. Foram utilizados 6 caprinos, inoculados por via subcutânea com a toxina tipo C, em doses de 500 a 15,6 DL50/kg de peso vivo, em diluições duplas seriadas. Os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de sintomatologia característica de botulismo e amostras de soro sanguíneo e fígado foram coletadas para pesquisa da toxina pelo bioensaio em camundongos. As doses de 500 e 250 DL50/kg induziram quadro agudo de botulismo evoluindo para a morte entre 42 e 46 horas pós-inoculação. A toxina foi detectada somente no soro do animal que recebeu a dose de 500 DL50/kg. Os animais que receberam as doses de 125, 62,5 e 31,3 DL50/kg desenvolveram quadro subagudo da doença, não sendo detectado a toxina nas amostras analisadas. Observou-se quadro crônico de botulismo no animal inoculado com a dose de 15,6 DL50/kg, não se constatando a presença da toxina no soro. Os resultados confirmaram a alta susceptibilidade dos caprinos à toxina botulínica tipo C, que apresentaram quadros clínicos semelhantes aos observados em bovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Botulismo experimental, caprinos, toxina botulínica tipo C, formas clínicas, diagnóstico laboratorial pelo bioensaio.

INTRODUÇÃO

Botulismo é uma enfermidade neuroparalítica causada pela ação de toxinas produzidas por *Clostridium botulinum*. Este microrganismo, sob a forma de esporos, é encontrado no solo, água e na matéria orgânica de origem animal e vegetal.

As toxinas botulínicas são classificadas em 8 tipos serologicamente distintos: A, B, C₁, C₂, D, E, F e G (Sugiyama 1980), embora possuam ações farmacológicas semelhantes. Atuam por meio de bloqueio da liberação de acetilcolina nas terminações neuro-motoras, impedindo a transmissão dos impulsos nervosos, o que resulta em um quadro de paralisia flácida.

As toxinas tipos C e D têm sido descritas nos casos de botulismo em ruminantes, particularmente na Austrália, África do Sul e Senegal (Theiler et al. 1927, Simmons & Tammemagi 1964, Doutre & Chambron 1966), onde foram observadas altas mortalidades em bovinos com quadro clínico de botulismo epizootico.

No Brasil, a doença em bovinos foi primeiramente diagnosticada no Estado do Piauí (Tokarnia et al. 1970) e mais tarde assinalada em Goiás (Moreira et al. 1980) e no Rio Grande do Sul (Turnes et al. 1984). No decorrer dos

¹ Aceito para publicação em 11 de fevereiro de 1993.

² Laboratório de Imunologia, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Uberlândia, Caixa Postal 593, Uberlândia, MG 38400-902.

³ Departamento de Medicina Animal, Univ. Fed. Uberlândia.

anos, o botulismo na sua forma epizootica assumiu grande importância para a pecuária no País, principalmente na região Centro-Oeste (Döbereiner et al. 1992). Nesses relatos a doença deveu-se à ingestão de ossos e restos de cadáveres abandonados nos pastos, nos quais havia condições de anaerobiose favoráveis à proliferação de *Clostridium botulinum* e produção da toxina. A osteofagia está associada à deficiência de fósforo nas pastagens, bem como à falta de suplementação adequada deste mineral aos bovinos.

Em caprinos, não se têm descrito casos espontâneos de botulismo, embora esta espécie seja susceptível à ação da toxina C, que é geralmente o tipo responsável pelo botulismo associado à ingestão de forragens contaminadas (Smith 1977).

Fjoistad (1973) em trabalho experimental em caprinos, através da administração oral de toxina botulínica tipo C beta determinou que doses de 500 a 1.000 MMLD/kg (minimum mouse lethal dose) de peso vivo são capazes de provocar sintomas e morte por botulismo nesta espécie.

O presente trabalho teve como objetivos: (1) estabelecer as doses de toxina botulínica tipo C, em DL₅₀/kg de peso vivo, necessárias para produzir sintomatologia e/ou morte em caprinos quando inoculadas por via subcutânea; (2) determinar as diferentes formas clínicas do botulismo, correlacionando-as com os quadros observados em bovinos; (3) avaliar o diagnóstico laboratorial de bioensaio pela detecção da toxina em amostras de soro e fígado dos animais inoculados.

MATERIAL E MÉTODOS

Toxina

A amostra de toxina botulínica tipo C utilizada foi gentilmente cedida pelo Laboratório Vallée Nordeste S/A (Montes Claros, MG), consistindo de filtrados de culturas de *Clostridium botulinum* tipo C, sob condições estritas de anaerobiose (Wright 1933). A potência do filtrado foi determinada através de inoculação e camundongos (Notermans et al. 1982), calculando-se a DL₅₀ pelo método de Reed & Muench (1938).

A potência da toxina botulínica tipo C utilizada no experimento foi calculada em 10.000 DL₅₀/ml, determinada após inoculação intraperitoneal em camundongos.

Tipificação da toxina botulínica

Para a confirmação do tipo da toxina botulínica utilizada foi realizado o teste de soroneutralização em camundongos, de acordo com as normas recomendadas pelo Center for Disease Control (CDC), Atlanta, Georgia, USA. As antitoxinas botulínicas monovalentes tipos A, B, C, D e E (1 UI), procedentes do Instituto Pasteur (Paris), foram misturadas à toxina, na proporção de 1:2 e inoculadas em 2 camundongos, por via intraperitoneal, num volume de 0,5 ml, após prévia incubação por 30 minutos a 37°C em banho-maria. Os animais foram observados durante 4 dias e considerou-se o teste positivo quando os animais sobreviviam até o final do período de observação.

A toxina foi comprovada como sendo do tipo C, através do teste de soroneutralização em camundongos, pela não neutralização com as antitoxinas botulínicas monovalentes tipos A, B, D e E, ocorrendo a neutralização somente com a antitoxina tipo C.

Animais

Foram utilizados 6 caprinos mestiços, machos, com peso entre 22 e 57,5 kg, cedidos pelo Setor de Caprinocultura da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos em baias individuais. Durante o período foram feitas mensurações diárias da ingestão de água e alimento (capim *camerum* picado).

A toxina botulínica tipo C foi inoculada, por via subcutânea, em diluições duplas seriadas a partir da dose de 500 DL₅₀/kg de peso vivo, como é demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1. Esquema da inoculação de caprinos, por via subcutânea, com a toxina botulínica tipo C

Caprino	Peso (kg)	Volume (ml)	Dose	
			DL ₅₀ /kg	DL ₅₀ /total
1	57,5	2,87	500	28.750
2	22,0	0,55	250	5.500
3	45,0	0,56	125	5.625
4	31,2	0,20	62,5	1.950
5	29,0	0,10	31,3	906
6	34,0	0,05	15,6	531

Avaliação clínica

Os animais foram observados, diariamente, quanto ao desenvolvimento de sintomatologia característica de botulismo. Determinaram-se as diferentes formas clínicas (superaguda, aguda, subaguda e crônica), em função do tempo decorrido desde o início dos sintomas até à morte do animal. Paralelamente, foram registrados parâmetros clínicos relativos à frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, temperatura e mucosas visíveis.

Avaliação laboratorial

Foram realizadas colheitas de sangue, prévia e periodicamente após a inoculação, sendo que nos primeiros 2 dias, as sangrias foram feitas a cada 12 horas e nos dias posteriores, a cada 24 horas, objetivando-se a detecção da toxina no soro, através de bioensaio em camundongos, segundo as normas recomendadas pelo CDC.

Nos casos de morte, foram realizadas necropsias, registrando-se os achados anátomo-patológicos. Foram coletadas amostras de fígado, baço, cérebro, cerebelo e linfonodos mesentéricos para exames histopatológicos, sendo que as amostras de fígado também foram analisadas pelo bioensaio em camundongos, para pesquisa da toxina botulínica.

RESULTADOS

Avaliação clínica

Como demonstrado no Quadro 2, os Caprinos 1 e 2, inoculados com as doses de 500 e 250 DL₅₀/kg, respectivamente, desenvolveram quadros agudos de botulismo, com início dos sintomas após 26 horas (Capr. 1) e 30 horas (Capr. 2) da inoculação. Foram observados anorexia, adipsia, incoordenação motora progressiva, permanecendo os animais em decúbito esterno-abdominal, paralisia da língua com exteriorização espontânea, sialorréia, paralisia dos músculos torácicos evidenciada por respiração fortemente abdominal, evoluindo para a morte após 42 horas (Capr. 1) e 46 horas (Capr. 2) da inoculação (Fig. 1).

Quadro 2. Resultados da avaliação clínica e laboratorial dos caprinos inoculados, por via subcutânea, com a toxina botulínica tipo C

Caprino	Dose DL ₅₀ /kg	Detecção da toxina		Sobrevivida (horas)	Quadro clínico de botulismo
		Soro	Fígado		
1	500	+	-	42	Agudo
2	250	-	-	46	Agudo
3	125	-	-	76	Subagudo
4	62,5	-	-	94	Subagudo
5	31,3	-	-	140	Subagudo
6	15,6	-	NR ^a	Não letal	Crônico

^aNR = não realizado.



Fig. 1. Caprino 2 inoculado com 250 DL₅₀/kg da toxina botulínica tipo C, após 38 horas de inoculação (quadro agudo).

Nos Caprinos 3, 4 e 5, inoculados, respectivamente com 125, 62,5 e 31,3 DL₅₀/kg, observou-se sintomatologia característica de botulismo semelhante à descrita anteriormente, porém com diferentes períodos de incubação: 41 horas (Capr. 3) e 72 horas (Capr. 4 e 5). Os sintomas evoluíram de forma gradativa até à morte, que ocorreu às 76 horas (Capr. 3), 94 horas (Capr. 4) e 140 horas (Capr. 5) pós-inoculação, caracterizando quadro subagudo da doença nos três casos.

O Caprino 6, que recebeu 15,6 DL₅₀/kg, desenvolveu quadro crônico de botulismo, com início dos sintomas após 96 horas da inoculação. O animal mostrou-se apático, diminuindo a ingestão de alimento e água a aproximadamente 1/3 da quantidade normal, ficando longos períodos em decúbito esternal, com dificuldade para se levantar e ligeira incoordenação motora. Este quadro perdurou por cerca de 4 semanas evoluindo para a recuperação do animal, porém com redução de 25 a 30% do seu peso.

Os parâmetros clínicos relativos à frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, temperatura e mucosas visíveis, não apresentaram alterações relevantes.

Avaliação laboratorial

A presença da toxina botulínica só foi constatada no soro sanguíneo do Caprino 1, inoculado com 500

DL₅₀/kg, em amostra colhida às 18 horas, não sendo mais detectada nas amostras de soro colhidas subsequentemente às 30 e 42 horas pós-inoculação. Nas amostras de soro dos caprinos 2, 3, 4, 5 e 6 bem como nas amostras de fígado dos animais necropsiados (Capr. 1, 2, 3, 4, 5) não foi confirmada a presença da toxina botulínica, pelo bioensaio em camundongos (Quadro 2).

Os achados de necropsia não revelaram lesões específicas e ao exame histopatológico, observaram-se hemorragias perivasculares e edema cerebral, mais acentuados nos Caprinos 3, 4 e 5.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os caprinos apresentam alta susceptibilidade à toxina botulínica tipo C, embora não se tenham relatos da ocorrência de botulismo natural nesta espécie (Smith 1977).

Em trabalho experimental, utilizando a toxina botulínica tipo C β , por via oral, Fjølstad (1973) determinou as doses capazes de induzir sintomatologia e morte por botulismo em caprinos estabelecendo que 1 MMLD corresponde a 1,2 - 1,3 DL₅₀. Desta forma, a dose letal de 500 MMLD/kg correlaciona-se aproximadamente a 650 DL₅₀/kg. Observou ainda que o tipo de alimento pode ter alguma influência sobre a evolução e a letalidade do botulismo em caprinos uma vez que os animais tratados com pastagens ou silagens toleravam doses maiores de toxina que aqueles alimentados com feno.

Simmons & Tammemagi (1964) demonstraram em botulismo bovino experimental pela toxina tipo D, que a via oral requer uma quantidade de toxina significativamente maior que a via parenteral (subcutânea), para produzir quadros clínicos de botulismo correspondentes. Em trabalho de botulismo experimental realizado em bovinos com a toxina botulínica tipo D, por via subcutânea, foi observado que a dose mínima para causar sintomas e/ou morte estaria entre 500 e 350 DL₅₀/kg (Cardoso et al., dados não publicados).

Neste experimento, foi utilizado a unidade DL₅₀/kg para melhor definir a quantidade de toxina botulínica (determinada pela toxicidade em camundongos) necessária para causar sintomatologia e/ou morte em caprinos. Desta forma, a grande variação do peso corporal dos animais em experimentação (22 a 57,5 kg) não influenciou a evolução e letalidade da doença, uma vez que as doses de toxina foram administradas em função do peso vivo de cada animal e não em termos de volume.

Assim, utilizando-se doses de toxina botulínica tipo C de 500 a 15,6 DL₅₀/kg, em diluições duplas seriadas, foram observadas as formas clínicas gradativas da doença: aguda, subaguda e crônica. Por conseguinte, foi estabelecido a dose mínima letal (31,3 DL₅₀/kg) necessária para induzir quadro subagudo de botulismo em caprinos.

As formas clínicas aguda e subaguda não mostraram diferenças significativas entre si quanto aos sintomas apresentados pelos animais inoculados, porém observaram-se variações no período de incubação e tempo de evolução dos sintomas até a morte, que apresentaram uma

relação inversa com a dose inoculada. Estes sintomas foram semelhantes aos observados em caprinos por Fjølstad (1973) bem como em bovinos por Simmons & Tammemagi (1964).

O quadro crônico apresentado pelo caprino 6 muito se assemelhou à forma clínica correspondente em bovinos (Simmons & Tammemagi 1964), enfatizando-se a anorexia e adipsia como sintomas precoces e predominantes, resultando em considerável perda de peso.

O diagnóstico laboratorial só pôde ser confirmado em um dos casos agudos, pela detecção da toxina somente no soro do animal que recebeu a dose mais alta de toxina C (500 DL₅₀/kg) e apenas na primeira amostra analisada às 18 horas pós-inoculação. Estes dados são concordantes com os relatos de Simmons & Tammemagi (1964) e Cardoso et al. (dados não publicados) que evidenciaram a presença da toxina no soro de bovinos como forma superaguda de botulismo experimental, detectada pelo bioensaio em camundongos. Nos demais casos agudo, subagudo e crônico, a presença da toxina não pôde ser comprovada, provavelmente em virtude das menores doses inoculadas. A toxina não foi constatada em amostras de fígado dos animais necropsiados, coletadas e processadas imediatamente após a morte dos mesmos. Os relatos de Fjølstad (1973) sobre botulismo experimental em caprinos demonstraram a presença da toxina C beta em amostras de fígado somente quando coletadas após 20 horas da morte. Isto sugere que a toxina encontrada no fígado pode ter sido um evento *post-mortem*, pela migração de bactérias do trato gastrintestinal ao fígado, portanto, sem valor para o diagnóstico.

A ausência de lesões específicas nos achados de necropsia e a presença de hemorragias perivasculares e edema cerebral também foram observados em botulismo bovino, relatados por Pamukcu (1954), Simmons & Tammemagi (1964), e Blood et al. (1988).

Os resultados do presente trabalho confirmaram a extrema susceptibilidade dos caprinos à toxina botulínica tipo C, apresentando quadros clínicos de botulismo muito semelhantes aos observados em bovinos. A dificuldade do diagnóstico da doença, através da detecção da toxina

em amostras de soro e fígado pelo bioensaio em camundongos, também é verificada nesta espécie, a não ser nos quadros superagudos, quando doses suficientes de toxina estão presentes nas amostras analisadas.

Agradecimentos.- Os autores agradecem ao Dr. Gabriel A. Pereira Filho, do Laboratório Valée Nordeste S/A, pelo fornecimento da toxina utilizada no experimento.

REFERÊNCIAS

- Blood D.C., Henderson J.A. & Radostits O.M. 1988. Doenças causadas por Bactérias. II. Botulismo. Clínica Veterinária. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 428-430.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H., Langenegger J. & Dutra I.S. 1992. Epizootic Botulism of cattle in Brazil. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 99(5):188-190.
- Doutre M.P. & Chambron J. 1966. Le botulisme des ruminants et des équidés au Sénégal. Caractères de la souche isolée de *Clostridium botulinum* et de sa toxine. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 19:495-519.
- Fjølstad M. 1973. The effects of clostridium toxin type C β given orally to goats. Acta Vet. Scand. 14:69-80.
- Moreira E.C., Lima J.D. & Leite R.C. 1980. Botulismo no sul de Goiás e Marajó. Anais 17º Congr. Bras. Med. Vet., Fortaleza, p. 24. (Resumo)
- Notermans S., Dufrenne J. & Kozaki S. 1982. The relation between toxicity and toxin-related antigen contents of *Clostridium botulinum* types C and D cultures as determined by mouse bioassay and ELISA. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 35:203-211.
- Pamukcu A.M. 1954. Hemorrhagic encephalomyelitis due to botulism in cattle in Turkey. Zentrbl. Vet. Med. 1:707-722.
- Reed L.J. & Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497.
- Simmons G.C. & Tammemagi L. 1964. *Clostridium botulinum* type D as a cause of bovine botulism in Queensland. Aust. Vet. J. 40:123-127.
- Smith L.D. 1977. Botulismo, p. 82-127. El microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Ed. Acirbia, Zaragoza (España).
- Sugiyama H. 1980. *Clostridium botulinum* neurotoxin. Microbiol. Rev. 44(3):419-448.
- Theiler A., Viljoen P.R., Green H.H., Du Toit P.J., Meier H. & Robinson E.M. 1927. Lamsiekte (parabotulism) in cattle in South Africa. Rep. Dir. Vet. Educ. Res., South Africa, 11/12:821-1361.
- Tokarnia C.H., Langenegger J., Langenegger C.H. & Carvalho E.V. 1970. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. Pesq. Agropec. Bras. 5:465-472.
- Turnes C.G., Langenegger J. & Scarsi R.M. 1984. "Mal do Alegrete": evidências de *Clostridium botulinum* D como agente etiológico. Anais 19º Congr. Bras. Med. Vet., Belém, p. 138.
- Wright H.D. 1933. The importance of adequate reduction of peptone in the preparation of media for pneumococcus and other organisms. J. Path. Bact., Edinburgh, 37:257.

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Sisyrinchium platense* (Iridaceae) EM BOVINOS¹

MARIA DEL CARMEN MÉNDEZ^{2,3}, PAULO EDUARDO DELGADO⁴, ROSELAINÉ SANTOS⁵,
ARI SECHIN⁴, e FRANKLIN RIET-CORREA^{2,3}

ABSTRACT.- Méndez M.C., Delgado P.E., Santos R., Sechin A. & Riet-Correa F. 1993. [Experimental intoxication by *Sisyrinchium platense* (Iridaceae) in cattle.] Intoxicação experimental por *Sisyrinchium platense* (Iridaceae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(3/4):77-81. Laboratório Regional de Diagnóstico, Fac. Vet., Univ. Fed. Pelotas, Campus Universitário, Pelotas, RS 96010-900, Brazil.

Sisyrinchium platense collected in January, June, August and November was given experimentally to cattle and sheep. For cattle the plant was most toxic in November (spring), when in flower, causing severe haemorrhagic diarrhea at doses of 22.6 and 29.9 g of the green plant per kg of body weight. During the other seasons *S. platense* caused discrete to moderate diarrhea at doses from 20 to 40 g per kg of body weight. *S. platense* was non toxic for sheep at doses up to 60 g of the green plant per kg of body weight. These results suggest that *S. platense*, which is occasionally consumed by animals transported from areas where the plant does not grow, is responsible for some outbreaks of diarrhea observed in cattle immediately after transportation.

INDEX TERMS: Poisonous plants, plant poisoning, diarrhea, *Sisyrinchium platense*, Iridaceae, cattle, sheep.

SINOPSE.- Com o objetivo de determinar a toxicidade de *Sisyrinchium platense* ("alho-macho") e estudar alguns aspectos epidemiológicos relacionados à diferença de toxicidade nas diferentes estações do ano, a planta foi administrada experimentalmente a bovinos e ovinos. As amostras foram colhidas nos meses de janeiro, junho, agosto e novembro e administradas por via bucal aos animais experimentais. Para bovinos, a planta foi mais tóxica na primavera, em floração, observando-se severa diarreia hemorrágica em doses que variaram entre 22,6 e 29,9 g de planta verde por kg de peso vivo. Nas outras épocas do ano, *S. platense* causou diarreia discreta ou moderada em doses entre 20 e 40 g/kg. Para os ovinos a planta não foi tóxica em doses de até 60 g/kg. Esses resultados e o fato de que a planta é consumida somente por animais transportados, procedentes de áreas onde não ocorre *S. platense*, evidenciam que a mesma seja responsável por alguns surtos de diarreia em bovinos que ocorrem na região Sul do Rio Grande do Sul.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, intoxicação por planta, diarreia, *Sisyrinchium platense*, Iridaceae, bovinos, ovinos.

INTRODUÇÃO

Na região sul do Estado do Rio Grande do Sul, principalmente nos municípios de Pinheiro Machado, Herval,

Jaguarão e Bagé, alguns produtores relatam que quando são transportados bovinos ou ovinos, oriundos de regiões onde não existe *Sisyrinchium platense* ("alho-macho" ou "alho-bravo"), para campos onde ocorre a planta, alguns animais a ingerem, ocorrendo casos de intoxicação. A doença caracteriza-se por uma diarreia escura, sendo que alguns animais morrem e outros se recuperam, apresentando, no entanto, atraso no seu desenvolvimento. A maioria dos históricos afirma que a intoxicação ocorre somente em animais criados em áreas onde a planta não existe e que são transportados para regiões onde *S. platense* cresce em abundância, portanto, pareceria que essa planta é consumida pelos animais que a desconhecem. *S. platense* não é consumida pelos animais criados no local. A ingestão da planta, pelos animais que a desconhecem, ocorre logo após o ingresso destes na área; posteriormente os animais não mais a ingerem.

Alguns produtores dizem que, às vezes, os animais ingerem a planta quando são submetidos a condições de fome, principalmente no inverno, em épocas de carência de forragem e/ou quando há superlotação dos campos, podendo ocorrer casos de intoxicação mesmo naqueles animais que "conhecem" o "alho-macho".

Em algumas oportunidades menciona-se a possibilidade de que a doença ocorra, em bovinos, com uma incidência maior na primavera, quando *S. platense* está em floração.

Em ovinos, segundo os históricos, a intoxicação ocorreria principalmente em animais jovens, cordeiros recém-

¹ Aceito para publicação em 15 de fevereiro de 1993.

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

³ Bolsista Pesquisador do CNPq.

⁴ Bolsista de Iniciação Científica, CNPq.

⁵ Bolsista de Aperfeiçoamento, CNPq.

desmamados, nas mesmas condições em que ocorre nos bovinos.

Uma revisão da literatura revela que a família Iridaceae contém 57 gêneros e cerca de 800 espécies, sendo a maioria nativas da África do Sul e América tropical (Hurst 1942, Everist 1974). Na Austrália, duas espécies, *S. iridifolium* e *S. micranthum*, introduzidas a partir da América do Sul, encontram-se amplamente distribuídas naquele país, mas em pequenas quantidades. Ocorrem em campos nativos, em solos pouco drenados e de pastagem grosseira (Everist 1974).

S. iridifolium e *S. micranthum*, na Austrália, têm sido considerados, em diversas ocasiões, como espécies suspeitas de serem tóxicas para o gado e de causarem surtos de intoxicação caracterizados pelo aparecimento de diarreia sem que, no entanto, tenha sido comprovada a toxicidade dessas espécies (Hurst 1942, Everist 1974).

Potts (1903), na Austrália, relata a morte de 6 ovelhas que teriam ingerido *S. micranthum* e que apresentavam, na necropsia, o abomaso repleto das sementes do mesmo. As paredes do abomaso estavam congestionadas e no intestino havia áreas de congestão.

Dentro da família Iridaceae incluem-se diversas plantas ornamentais, cultivadas em jardins, como os frís, os gladiólos, também o açafreão e espécies silvestres de frís.

Estes contêm, nos rizomas, uma substância amarga, ácida, denominada iridin, que atua como irritante e purgante do trato gastrointestinal, ocasionando diarreia hemorrágica (Muenscher 1951, Clarke et al. 1981). Os casos de intoxicação são raros, provavelmente, devido ao fato dos animais não ingerirem grandes quantidades des-

as plantas em função do seu sabor amargo (Muenscher 1951), porém há relatos de surtos de diarreia em animais alimentados com feno que continha folhas de frís (Clarke et al. 1981).

Plantas do gênero *Homeria*, pertencentes também a família Iridaceae, igualmente apresentam toxicidade para bovinos. A doença caracteriza-se por diarreia, depressão geral e, às vezes, paralisia (Hurst 1942, Everist 1974). Flores, folhas e bulbos da planta são tóxicos (Hurst 1942). A intoxicação ocorre em animais introduzidos em área onde existem essas plantas que, geralmente, estão famintos e não conhecem a planta, já que os bovinos criados onde crescem plantas desse gênero não as consomem (Hurst 1942, Everist 1974).

Os objetivos do presente trabalho foram determinar a toxicidade para bovinos e ovinos de *S. platense* e estudar a toxicidade da planta nas diferentes estações do ano e/ou as variações em função do seu ciclo vegetativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para testar a toxicidade de *Sisyrinchium platense* (fam. Iridaceae)⁶ em bovinos e ovinos, amostras do mesmo foram colhidas em um estabelecimento do município de Pinheiro Machado onde existia histórico da ocorrência de intoxicação.

⁶ *Sisyrinchium platense* é uma planta perene, de até 50 cm de altura, floresce na primavera, apresenta inflorescências púrpuras, e produz bulbo pequeno como a maioria das espécies da família Iridaceae. No Rio Grande do Sul, *S. platense* tem sido observado em pastagens nativas, em solos úmidos, de boa fertilidade e áreas modificadas (Ravenna 1968). É considerada como planta indesejável por ser rejeitada pelos animais, seja por sua toxidez ou baixa palatabilidade e ainda por que compete por espaços com outras espécies forrageiras (Gonçalves et al. 1988).



Fig. 1. *Sisyrinchium platense*. Inflorescência. Município de Pinheiro Machado, RS.

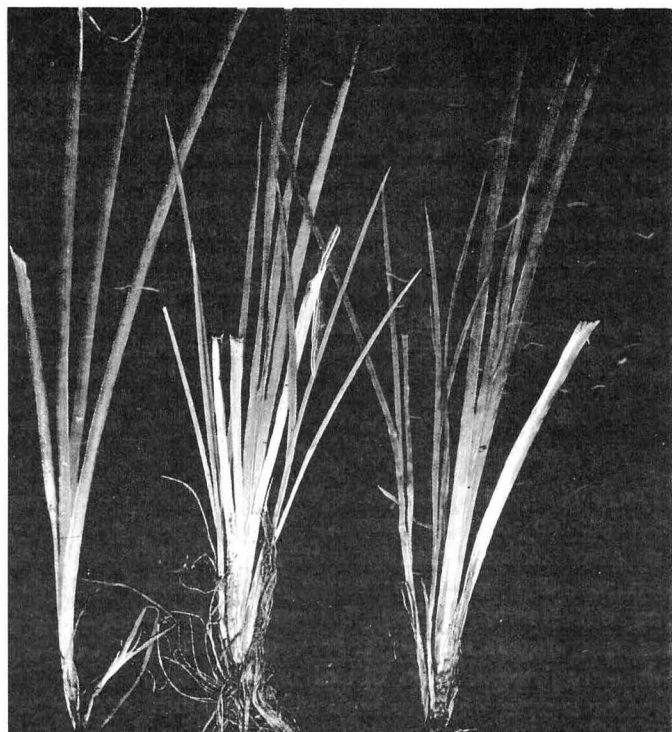


Fig. 2. *Sisyrinchium platense*. Fase vegetativa. Município de Pinheiro Machado, RS.

As plantas foram colhidas sempre no mesmo potreiro do estabelecimento, na primavera, no mês de novembro de 1989 e 1991 (fase de floração) (Fig. 1); no verão, no mês de janeiro de 1991 e 1992 (fase de sementação); no outono, no mês de junho de 1991 e 1992 (fase vegetativa); e no inverno, no mês de agosto de 1990, 1991 e 1992 (fase vegetativa) (Fig. 2). Essas amostras foram congeladas após a colheita até sua utilização por períodos que variaram entre 1 a 3 meses; faziam exceção as plantas colhidas em janeiro e junho de 1992 e agosto de 1992 que foram refrigeradas e administradas aos animais experimentais em um período de até 2 dias após a coleta.

Experimentos com bovinos

Cada bovino experimental era pesado e mantido em jejum durante 24 horas antes da administração da planta. Antes de iniciar o experimento era realizado um exame clínico avaliando-se a frequência cardíaca, os movimentos respiratórios, os movimentos ruminais, a coloração das mucosas, a temperatura corporal, o aspecto geral e a consistência das fezes. Esse exame clínico era feito novamente 24 e 48 horas após a administração da planta, período no qual os bovinos permaneceram estabulados, em observação, recebendo água e ração comercial à vontade. Após esse período os animais foram soltos a campo e permaneceram em observação por um período de 7 a 10 dias.

A planta foi administrada por via oral durante 1 a 2 dias, até atingir uma dose entre 10 e 40 g/kg de peso do animal ou até a administração ser suspensa devido ao fato de o bovino apresentar diarreia ou sinais de dor abdominal.

No Quadro 1 constam os dados referentes ao peso dos bovinos experimentais, à época de colheita de *S. platense* (mês e ano), à quantidade de planta verde administrada e ao período de administração.

Experimentos com ovinos

Os ovinos utilizados nos experimentos eram pesados e mantidos em jejum por 24 horas antes de iniciar-se o experimento.

Exame clínico geral foi realizado, em todos os animais, antes de iniciar-se a administração da planta e, também, 24 horas após.

Neste experimento foram administradas amostras de *S. platense* coletadas no mesmo local e na mesma época que os utilizados nos experimentos com bovinos.

A administração era feita por via oral durante um período variável de 1 a 3 dias até ser atingida a dose pré-estabelecida.

O peso dos ovinos experimentais, a quantidade de planta administrada, o período de administração e a época de colheita da planta costam no Quadro 2.

RESULTADOS

Experimentos com bovinos

No Quadro 1 constam os dados referentes à intoxicação experimental por *Sisyrinchium platense* em bovinos.

Alguns animais (Bov. 1, 3, 5, 10) consumiram espontaneamente a planta no primeiro momento, certamente em consequência da fome, devido ao jejum prévio ao experimento e, também, por desconhecimento da mesma. A quantidade da planta verde ingerida espontaneamente foi variável, entre 100 g (Bov. 3) e 1.350 g (Bov. 1), equivalente a 1 g/kg e 7,5 g/kg de peso, respectivamente. Apesar disso, a maioria dos bovinos experimentais, após algumas horas de administração forçada, começavam a rejeitar a planta, negando-se a mastigá-la ou engolir-la o que evidenciou a pouca palatibilidade de *S. platense* para essa espécie animal.

Corrimento nasal, ocular e/ou sialorréia foram evidenciados a partir do momento em que o bovino iniciava a mastigação da planta. Essa sintomatologia diminuía ou cessava quando a administração era suspensa, voltando a ser evidente quando o animal recebia novamente a planta.

Quadro 1. Intoxicação experimental por *Sisyrinchium platense* em bovinos

Bovino	Planta administrada			Época de colheita da planta mês/ano	Sintomas	
	Nº	Peso em kg	Períodos de administração em dias		Dose total administrada g/kg	Manifestações durante a administração
1	180	2	22,6	Novembro/89	Corrimento nasal abundante	+++ ^b
2	86	2	29,9	Novembro/89	Corrimento ocular e sialorréia abundante	+++
3	95	1	26,0	Novembro/91	Corrimento nasal discreto	++
4	70	1	37,5	Janeiro/91	Corrimento nasal e ocular discretos	-
5	75	2	24,6	Janeiro/91 ^a	Corrimento nasal discreto	++
6	128	2	25,0	Janeiro/92	Corrimento nasal discreto	+
7	98	1	40,0	Junho/91	-	+
8	100	1	23,6	Junho/91	Corrimento nasal e ocular discretos	-
9	95	1	33,5	Junho/92	-	-
10	139	1	20,0	Agosto/90	Corrimento nasal e sialorréia discretos	+
11	70	1	10,0	Agosto/90	-	-
12	98	1	16,8	Agosto/92	-	+
13	92	1	40,0	Agosto/92	Corrimento nasal discreto	++

^a A planta estava em floração.

^b +++ Diarreia hemorrágica, ++ diarreia moderada, + diarreia discreta, - ausente.

Adicionalmente, 9 animais (Bov. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 13) apresentaram diarreia. Esta foi observada 24 horas após finalizado o consumo de *S. platense*, com exceção dos Bovinos 1 e 2 em que foi vista 48 horas após, sendo que nestes últimos a diarreia era com sangue; no Bovino 1 era amarelada nas primeiras 48 horas e hemorrágica somente às 72 horas. Foram evidentes, também, sinais de dor, como gemidos e fortes contrações abdominais (Bov. 1, 2, 10).

Com exceção dos Bovinos 4 e 7 que apresentaram movimentos ruminais normais, os demais animais experimentais mostraram diminuição do número de movimentos ruminais a partir das 24 horas após iniciada a administração da planta; os Bovinos 1 e 10 apresentaram ausência de movimentos ruminais às 72 e 24 horas, respectivamente.

Nos Bovinos 9 e 11 não foram observados sinais clínicos. Os outros parâmetros clínicos avaliados estavam dentro dos valores normais em todos os bovinos experimentais.

Experimentos com ovinos

Os dados referentes ao experimento com ovinos constam no Quadro 2. Não foram observadas quaisquer manifestações clínicas durante a administração da planta. No exame clínico realizado 24 horas após finalizado o consumo de *S. platense*, os parâmetros avaliados estavam dentro dos valores normais em todos os ovinos experimentais.

Quadro 2. Intoxicação experimental por *Sisyrinchium platense* em ovinos

Nº	Ovino		Planta administrada		Época de colheita da planta mês/ano	Sintomas
	Peso em kg	Períodos de administração em dias	Dose total administrada g/kg			
1	14	1	20		Agosto/90	-
2	17,20	1	30		Agosto/90	-
3	10,50	1	40		Agosto/90	-
4	21	1	40		Agosto/90	-
5	38	3	42,36		Agosto/90	-
6	45	2	60,40		Agosto/90	-
7	31	2	60,32		Novembro/91	-
8	28,70	1	35,89		Janeiro/91	-
9	47	3	60,21		Janeiro/91 ^a	-
10	24	1	63,75		Junho/91	-

^a A planta estava em floração.

DISCUSSÃO

O experimento em bovinos demonstrou que *Sisyrinchium platense* é tóxico para essa espécie e causa uma doença caracterizada pelo aparecimento de diarreia após 24 a 72 horas da sua ingestão. Segundo relatos de produtores de diversos municípios da região Sul de nosso Estado, surtos de intoxicação por *S. platense* ocorrem somente em bovinos criados onde a planta não existe e que são transpor-

tados para áreas onde ocorre; portanto, parece que *S. platense* é consumido por animais que o desconhecem. Fato similar é verificado na intoxicação por *Baccharis coridifolia* ("mio-mio") no Rio Grande do Sul (Tokarnia & Döbereiner 1975, 1976), mas, apesar de *B. coridifolia* existir naqueles municípios em algumas áreas, nos estabelecimentos em que foram colhidos os históricos sobre intoxicação por *S. platense* não existia *B. coridifolia*.

Menciona-se também que, em algumas oportunidades, *S. platense* pode ser consumido pelos bovinos quando há carência de forragem ou em casos de superlotação. Neste trabalho ficou evidenciado que os bovinos podem ingerir espontaneamente pequenas quantidades de *S. platense* quando estão com fome ou desconhecem a planta, mas depois de uma primeira ingestão, não mais o consomem, fato que coincide com os históricos.

Em nossos experimentos ficou evidenciada a baixa palatabilidade de *S. platense* para bovinos, já que os animais rejeitavam a planta, negando-se a mastigá-la, o que dificultava bastante a administração. A presença de sialorréia abundante e corrimento nasal e ocular que foram observados em 9 dos 13 bovinos experimentais, mostraram que a planta tem, também, um efeito irritante. Através deste experimento realizado em bovinos, verificou-se que *S. platense* exerce ação sobre o trato gastrointestinal provocando diminuição dos movimentos ruminais, dores abdominais e diarreia, às vezes com presença de sangue.

Alguns produtores do município de Pinheiro Machado mencionam que os casos de intoxicação ocorrem, principalmente, em novembro e dezembro. Nessa época *S. platense* está em floração e freqüentemente são introduzidos animais nos estabelecimentos, nesses meses. Pelos resultados deste trabalho parece que a planta tem uma maior toxicidade, para bovinos, na fase de floração, já que os quadros clínicos mais graves, com presença de diarreia intensa e hemorrágica, foram observados nos Bovinos 1, 2 e 3 que receberam a planta colhida em novembro, com flores, e no Bovino 5 que consumiu *S. platense* colhido em janeiro quando se encontrava ainda em floração. As quantidades de planta administradas a esses animais variaram entre 22,6 g/kg (Bov. 1) e 29,9 g/kg (Bov. 2).

Em junho, na fase de crescimento da planta, a doença foi reproduzida somente na dose de 40 g/kg (Bov. 7), observando-se uma diarreia discreta. Isto indica que, provavelmente, nessa época do ano, exista a necessidade de uma ingestão maior do que em outras épocas para que ocorra a intoxicação. A planta colhida em agosto, administrada ao Bovino 10, causou diarreia discreta, fortes contrações abdominais e ausência de movimentos ruminais, na dose de 20 g/kg e somente diarreia discreta na dose de 16,8 g/kg.

Para os ovinos, nas condições e doses testadas, *S. platense* não foi tóxica. Os históricos referem-se à ocorrência da intoxicação principalmente em cordeiros. Também na literatura é mencionado que a intoxicação ocorre

sobretudo em animais jovens. Em nossos experimentos foram utilizados *bovinos jovens*, de 3 a 4 meses de idade, nos quais se reproduziu a doença; porém nos *ovinos adultos* não se conseguiu causar sintomas de intoxicação. Desta maneira não se pode descartar a possibilidade da intoxicação em *ovinos jovens*, não utilizados nesta experimentação.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho é evidente a necessidade de recomendar aos produtores que, no caso de transporte de bovinos, principalmente na primavera, de regiões onde não existe *S. platense* para regiões nas quais a planta ocorre, sejam tomadas medidas preventivas que evitem a ingestão de grandes quantidades da planta. A medida mais lógica parece ser a de introduzir os animais nas áreas do estabelecimento onde a planta não ocorre ou existe em pouca quantidade e, após alguns dias, serem transportados para as áreas mais infestadas.

REFERÊNCIAS

- Clarke M.L., Harvey D.G. & Humphreys D.J. 1981. *Veterinary Toxicology*. 2 nd edition. Baillière Tindall, London, p. 228.
- Everist S.L. 1974. *Poisonous Plants of Australia*. Angus and Robertson Pty Ltd., p. 261-266.
- Gonçalves J.O.N., Girardi-Deiro A.M. & Gonzaga S.S. 1988. Campos naturais ocorrentes nos diferentes tipos de solos no município de Bagé, RS. 1. Caracterização, localização e principais componentes da vegetação. *Boletim de Pesquisa* nº 12, Embrapa-CNPO, Bagé, RS. 28 p.
- Hurst E. 1942. *The Poison Plants of New South Wales*. Poison Plants Committee, Sydney, N.S.W., p. 67-71.
- Muensch W.C. 1951. *Poisonous Plants of the United States*. Macmillan Company, New York, p. 57-58.
- Ravenna P.F. 1968. Iridaceae, p. 539-565. In: Cabrera A.L. (ed.) *Flora de la Provincia de Buenos Aires*. Talleres Graficos ISAGT, Buenos Aires.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1975. Intoxicação experimental em bovinos por "mio-mio", *Baccharis coridifolia*. *Pesq. Agropec. Bras.*, Sér. Vet. 10:79-97.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1976. Intoxicação experimental em ovinos por "mio-mio", *Baccharis coridifolia*. *Pesq. Agropec. Bras.*, Sér. Vet. 11:19-26.
- Potts H.W. 1903. Sheep poisoning at the Hawksbury Agricultural College. *Ag. Gaz.* New South Wales, XIV, p. 1212-1214. (Citado por Hurst 1942)

DIAGNÓSTICO DO BOTULISMO EM BOVINOS NO BRASIL PELA TÉCNICA DE MICROFIXAÇÃO DE COMPLEMENTO¹

IVERALDO S. DUTRA², HANS-ERICH WEISS³, HANNELORE WEISS⁴ e JÜRGEN DÖBEREINER⁵

ABSTRACT.- Dutra I.S., Weiss H.-E., Weiss H. & Döbereiner J. 1993. [Diagnosis of botulism of cattle in Brazil by micro-complement fixation.] Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(3/4):83-86. Depto Med. Veterinária, FOA, Unesp-Campus de Araçatuba, C.P. 533, Araçatuba, SP 16015-050, Brazil.

The heat induced micro-complement-fixation test was used for the laboratory diagnosis of botulism in cattle. The following specimens were collected in southeastern and central-western Brazil: Thirty six samples of blood serum, liver and rumen liquid from 23 bovines with clinical signs of botulism (a condition commonly called "doença da vaca caída" - fallen cow disease) and from 1 bovine inoculated subcutaneously with botulinum type C toxin. Samples of blood serum, liver and rumen liquid collected from healthy bovines were used as negative controls. Sixteen out of 17 serum samples were positive for botulinum toxin in cattle with clinical signs of acute, subacute and chronic botulism. All 9 liver samples were positive including those from chronic cases. Two samples of rumen liquid from bovines with the acute disease gave a positive test, but 2 other chronic cases were negative. All 3 samples collected from the bovine with subacute clinical signs gave positive results. From 36 samples examined, 31 were positive; of these 2 were of type C, 5 type D and 24 samples had to be grouped within the CD complex. All samples gave negative results with the mouse bioassay, including the material collected from the experimental case. In conclusion at least one sample of each of the 24 cases examined gave a positive result for botulinum toxin; thus this highly sensitive test confirmed the diagnosis that the "doença da vaca caída" is indeed botulism, caused by type C and D toxins.

INDEX TERMS: Heat induced micro-complement-fixation test, botulism, botulinum type C and D toxins, laboratory diagnosis, "doença da vaca caída", cattle, Brazil.

SINOPSE.- Foi utilizada a técnica de Microfixação de Complemento Induzida pelo Aquecimento para o diagnóstico laboratorial do botulismo em bovinos. Neste sentido foram colhidas, nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, 36 amostras constituídas por soro sanguíneo, fígado e líquido ruminal de 23 bovinos com quadro clínico de botulismo, vulgarmente conhecido como "doença da vaca caída", e de 1 bovino intoxicado experimentalmente pela toxina botulínica tipo C. Como controle negativo foram utilizados soro sanguíneo, fígado e líquido ruminal de bovinos sadios. De 17 soros examinados de bovinos com quadros clínicos agudo, subagudo e crônico, 16 foram positivos para a presença de toxina; todas as 9 amostras de fígado também foram positivas, mesmo de animais com intoxicação crônica. Duas amostras de líquido ruminal de bovinos com doença aguda foram positivas no teste, enquanto 2 amostras colhidas de animais com

evolução crônica foram negativas. As 3 amostras oriundas do bovino intoxicado experimentalmente e apresentando evolução subaguda, foram positivas na Microfixação. Das 36 amostras examinadas, 31 foram positivas no teste, sendo 2 pertencentes ao tipo C, 5 ao tipo D, e 24 agrupadas dentro do complexo CD. Todas essas amostras foram negativas no Bioensaio em camundongo, inclusive o material colhido do bovino intoxicado experimentalmente. Com base nos resultados, e tendo como referência o Bioensaio em camundongo, a Microfixação de Complemento demonstrou um excelente desempenho, permitindo o diagnóstico laboratorial de botulismo em pelo menos um material de cada um dos 24 casos examinados, confirmando assim o diagnóstico de que a "doença da vaca caída" é de fato botulismo causado pelas toxinas C e D.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Técnica de Microfixação de Complemento Induzida pelo Aquecimento, botulismo, toxinas botulínicas tipos C e D, diagnóstico laboratorial, "doença da vaca caída", bovinos, Brasil.

INTRODUÇÃO

O botulismo é uma importante causa de mortalidade de bovinos adultos no Brasil (Döbereiner et al. 1992). O diagnóstico da doença, vulgarmente denominada "doença

¹ Aceito para publicação em 26 de maio de 1993.

² Departamento de Medicina Veterinária, FOA, Unesp-Campus de Araçatuba, Caixa Postal 533, Araçatuba, SP 16015-050; bolsista CNPq 305967/85-1).

³ Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Heidelberg, Czernyring 2a/b, D-6900 Heidelberg 1, RFA.

⁴ Dreikreuzweg 4, D-6903 Neckargemünd, RFA.

⁵ Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 3851-970; bolsista CNPq (305294/88-1).

da vaca caída” tem sido estabelecido pela sintomatologia, ausência de lesões específicas, histórico e quadro epidemiológico. Laboratorialmente o diagnóstico é feito através da inoculação em camundongo de extrato hepático, soro sanguíneo ou conteúdo intestinal e ruminal de animais suspeitos e pela observação dos sinais da intoxicação; a confirmação ocorre quando a toxina presente no material testado é neutralizada pela antitoxina botulínica específica. Este procedimento é efetivo no diagnóstico do botulismo em aves, mas na maioria das vezes negativo quando utilizado em material proveniente de bovinos intoxicados.

O desenvolvimento e utilização de técnicas “in vitro” têm sido descritos, mas geralmente apresentam sensibilidade menor que a inoculação em camundongo (Smith 1977, Shone et al. 1985, Silva et al. 1991, Thomas 1991). Weiss & Weiss (1988) utilizaram a técnica de Microfixação de Complemento Induzida pelo Aquecimento no diagnóstico do botulismo em aves e verificaram uma sensibilidade 40 vezes superior que o Bioensaio em camundongo. Numa aplicação subsequente da técnica para o diagnóstico do botulismo em bovinos na Alemanha, Weiss et al. (1990) obtiveram resultados positivos em diferentes materiais biológicos.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar os resultados da utilização da Microfixação de Complemento no diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil, testando-se materiais colhidos em surtos da doença e de um caso experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita e preparo do material

Foram colhidas 36 amostras constituídas por soro sanguíneo (20), fígado (11) e líquido ruminal (5) de 23 bovinos com diagnóstico clínico de botulismo (“doença da vaca caída”), apresentando evoluções clínicas aguda, subaguda e crônica e de 1 caso subagudo de intoxicação experimental em bovino pela inoculação subcutânea de toxina botulínica tipo C, obtida de cepa de campo de *Clostridium botulinum*. As amostras foram colhidas logo no início da abordagem clínica (soro sanguíneo) ou quando da necropsia dos animais, transportadas sob refrigeração e conservadas a -20°C .

O preparo do material para realização da técnica foi de acordo com Weiss & Weiss (1988). Os soros sanguíneos foram centrifugados duas vezes a 3.000 rpm e filtrados em membrana de $0,25\ \mu\text{m}$. Após a filtração, alíquotas dos mesmos foram diluídas em tampão Veronal, pH 7,5, e aquecidas em banho-maria por 30 minutos a 56°C , para inativação do próprio complemento. As amostras de fígado foram maceradas com auxílio de areia estéril, diluídas 1:2 em tampão Veronal e o período de extração da toxina foi de no mínimo 1 hora; a inativação do complemento foi realizada como descrita para o soro. O processamento das amostras de líquido ruminal obedeceu os mesmos critérios. Os materiais assim preparados foram considerados antígenos prontos para uso.

Controle negativo

Para utilização como controle negativo na Microfixação de Complemento foram colhidas 5 amostras de soro sanguíneo, 4 de

fígado e 3 de líquido ruminal de bovinos sadios, abatidos em matadouro. Os mesmos procedimentos citados acima na conservação e preparo dos materiais suspeitos foram adotados.

Bioensaio em camundongo

Para realização do teste em camundongo as amostras de fígado colhidas foram maceradas, diluídas 1:2 em tampão gelatina-fosfato com pH 7,2, centrifugadas e passadas em filtro de Seitz. As amostras de soro sanguíneo e líquido ruminal foram centrifugadas, filtradas e utilizadas sem qualquer diluição. O período de observação dos camundongos foi de 4 dias a partir da inoculação de 0,5 ml do material via intraperitoneal.

Toxinas e antitoxinas botulínicas C e D

As toxinas botulínicas C e D utilizadas foram obtidas de cepas de *C. botulinum* homólogas, cultivadas em meio de cultura de Wright, com atividades biológicas de $3,2 \times 10^4$ DL₅₀/ml e $1,7 \times 10^4$ DL₅₀/ml, respectivamente, determinadas em camundongo. Para utilização como controle positivo no teste as toxinas foram diluídas 1:5 em tampão Veronal. As antitoxinas botulínicas C e D foram cedidas gentilmente pelo Instituto Pasteur de Paris, França, e “Statens Serum Institut” de Copenhagen, Dinamarca, respectivamente, e preparadas para uso no teste através da diluição 1:5 em tampão Veronal.

Microfixação de Complemento

Foi usada a técnica de Fixação de Complemento Induzida pelo Aquecimento, realizada em microplaca, denominada aqui Microfixação de Complemento, descrita por Weiss & Weiss (1988).

Componentes do sistema hemolítico e complemento. Hemácia de carneiro, hemolisina anti-hemácia de carneiro (Amboceptor) e complemento de cobaia (Behringwerk, Marburg, Alemanha) foram preparados de acordo com Weiss & Weiss (1988). Para utilização no sistema hemolítico 15 ml de eritrócitos a 1,5% foram diluídos em 28 ml de tampão Veronal e acrescidos de 1 ml de amboceptor.

Determinação da concentração de complemento. Para cada antígeno testado, incluindo-se os controles negativos, foi determinada preliminarmente a concentração de complemento de cobaia a ser utilizada na pesquisa principal. Diluições geométricas de complemento em tampão Veronal, variando de 1:2 a 1:56 foram realizadas em microplacas de 96 poços com fundo em U. Em cada poço correspondente às diluições foram pipetados 25 μl de antígeno pronto para uso. Após a homogeneização em agitador orbital o material foi incubado por 30 minutos a 37°C , seguindo-se a pipetagem de 50 μl do sistema hemolítico em cada poço. Novamente procedeu-se a homogeneização e incubação por mais 30 minutos a 37°C . Em seguida a microplaca foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. Duas concentrações simultâneas de complemento foram escolhidas: uma em que foi vista o primeiro botão de eritrócitos, e a diluição anterior.

Pesquisa principal. A série de poços situados no superior da microplaca com fundo em U foi utilizada para os materiais considerados controles negativos; cada amostra de soro sanguíneo testada teve como controle negativo uma outra amostra constituída também por soro e assim sucessivamente com os outros materiais. Em todos os poços foram pipetados 25 μl de tampão Veronal. Na primeira série, correspondente ao controle negativo foram pipetados 25 μl do material controle. Nas segundas e terceiras séries de poços foram pipetados 25 μl do antígeno pronto para uso. A partir da terceira fileira foi realizada uma diluição geométrica do material com auxílio de um diluidor manual. Em

seguida foram pipetados em todos os poços, inclusive os do material controle, antitoxina botulínica C ou D, simultaneamente em cada microplaca. Para cada material testado foram destinadas duas fileiras verticais correspondente às duas concentrações de complemento determinadas anteriormente; em cada poço foi pipetado 25 μ l de complemento. Logo após procedeu-se a homogeneização com auxílio de agitador orbital e incubação da microplaca por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação foram acrescentados 50 μ l do sistema hemolítico em todos os poços. Seguiu-se nova incubação por 30 minutos a 37°C, precedida também de homogeneização. Em seguida as microplacas foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm, procedendo-se então a leitura. Com base na antitoxina utilizada pode-se estabelecer o tipo de toxina presente no material analisado (antígeno). A reação foi considerada positiva quando os orifícios contendo o material controle apresentaram todas as hemácias lisadas, nas duas concentrações de complemento, e quando em pelo menos uma das concentrações do antígeno testado o botão de eritrócitos esteve presente. Em cada microplaca constou além do controle negativo, o controle positivo, constituído pela toxina botulínica C ou D.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Bioensaio em camundongo é considerado o teste mais específico para o diagnóstico do botulismo, apresentando, no entanto, baixa sensibilidade toxicológica. Isto faz com que numa frequência relativamente alta, materiais provenientes de bovinos suspeitos de intoxicação botulínica apresentem resultados negativos quando inoculados em camundongo (Thomas 1991). O desenvolvimento e emprego de técnicas imunológicas como a Hemaglutinação reversa passiva (Sakagushi et al. 1974), o Radioimunoensaio (Boroff & Schu-Chen 1973), a Imunodifusão (Mestrandrea 1974), a Imunofluorescência (Aalvik et al. 1973) e o teste de ELISA (Noack & Schliesser 1986) para detecção de toxina botulínica não tem contribuído satisfatoriamente para a substituição do Bioensaio, uma vez que possuem sensibilidade menor. Weiss & Weiss (1988) adaptaram o teste de Fixação de Complemento visando o diagnóstico do botulismo em aves, e estabeleceram, através do cálculo de diluições, que a Microfixação de Complemento Induzida pelo Aquecimento seria 40 vezes mais sensível que o Bioensaio. Dentro desta perspectiva foram analisados no presente trabalho 36 materiais provenientes de 23 bovinos com quadro sintomatológico de botulismo e de 1 caso reproduzido experimentalmente em bovino com toxina botulínica tipo C. Os resultados obtidos na análise das amostras de soro sanguíneo de bovinos com intoxicação botulínica aguda, sub-aguda e crônica são apresentados no Quadro 1. De 17 soros sanguíneos examinados, 16 foram positivos na Microfixação de Complemento. A dificuldade ocorreu, no entanto, na determinação do tipo de toxina botulínica presente no material, uma vez que 10 amostras apresentaram reações semelhantes tanto para toxina botulínica tipo C quanto para o tipo D; desta maneira, foram classificadas como pertencentes ao complexo CD. Da mesma forma, os extratos hepáticos examinados foram considerados positivos para o complexo CD, sendo apenas 1 amostra positiva para

Quadro 1. Resultado das amostras de soro bovino suspeitas de conter toxina botulínica, analisadas pelo Bioensaio em camundongo e na Microfixação de Complemento (MFC)

Evolução clínica	Nº de amostras examinadas	Nº de amostras positivas no Bioensaio	Nº de amostras positivas na MFC	Tipos de toxina		
				C	D	CD ^a
Aguda	13	0	13	2	3	8
Subaguda	2	0	2	0	0	2
Crônica	2	0	1 ^b	0	1	0

^a Agrupadas dentro de complexo CD.

^b Amostra colhida no início dos sintomas; o bovino sobreviveu.

Quadro 2. Resultado das amostras de fígado de bovinos com diagnóstico clínico-patológico de botulismo, analisadas pelo Bioensaio em camundongo e na Microfixação de Complemento (MFC)

Evolução clínica	Nº de amostras examinadas	Nº de amostras positivas no Bioensaio	Nº de amostras positivas na MFC	Tipos de toxina		
				C	D	CD ^a
Aguda	6	0	6	0	1	5
Subaguda	2	0	2	0	0	2
Crônica	1	0	1	0	0	1

^a Agrupadas dentro de complexo CD.

toxina botulínica tipo D (Quadro 2). Oguma et al. (1984) demonstraram que as toxinas tipos C e D possuem epítomos comuns e específicos e que alguns epítomos comuns contribuem para a neutralização cruzada observada entre os tipos C e D. Esta característica, associada ao fato da Microfixação de Complemento ser um teste qualitativo, certamente contribui para a dificuldade na determinação exata do tipo de toxina botulínica quando utilizado para análise de materiais de campo.

As amostras de líquido ruminal de bovinos apresentaram resultados positivos quando provenientes de animais com intoxicação botulínica aguda, e negativos quando obtida de animais com quadro crônico (Quadro 3). A detecção de toxina botulínica foi possível em extrato hepático de bovino com evolução crônica, quando necropsiado 12 dias após o início dos sintomas (Quadro 4).

Todos os materiais examinados na Microfixação de Complemento foram negativos no Bioensaio em camundongo. As amostras de toxinas botulínicas tipos C e D utilizadas como controle positivo no teste, foram positivas, matando os camundongos com os sintomas característicos dentro de poucas horas após a inoculação.

Os resultados obtidos no exame dos materiais oriundos do bovino intoxicado experimentalmente são apresenta-

Quadro 3. Resultado das amostras de líquido ruminal de bovinos com diagnóstico clínico-patológico de botulismo, analisadas pelo Bioensaio em camundongo e na Microfixação de Complemento (MFC)

Evolução clínica	Nº de amostras examinadas	Nº de amostras positivas no Bioensaio	Nº de amostras positivas na MFC	Tipos de toxina		
				C	D	CD ^a
Aguda	2	0	2	0	0	2
Crônica	2	0	0	0	0	0

^a Agrupadas dentro do complexo CD.

Quadro 4. Comparação do Bioensaio em camundongo com a Microfixação de Complemento de materiais colhidos de bovino com botulismo de evolução crônica, necropsiado 12 dias após o início dos sintomas

Material examinado	Bioensaio em camundongo	Microfixação	
		C	D
Soro sanguíneo	- ^a	-	-
Fígado	-	+ ^b	+
Líquido ruminal	-	-	-

^a Negativo; ^b Positivo.

Quadro 5. Resultado do Bioensaio em camundongo e da Microfixação de Complemento de materiais colhidos de um bovino com botulismo induzido experimentalmente, com evolução clínica subaguda

Material examinado	Nº de horas da colheita após início dos sintomas	Bioensaio em camundongo	Microfixação	
			C	D
Soro sanguíneo	12	- ^a	+ ^b	+
Soro sanguíneo	72	-	+	+
Fígado	72	-	+	+

^a Negativo; ^b Positivo.

dos no Quadro 5. Da mesma forma que nos materiais examinados acima, o Bioensaio em camundongo foi negativo; na Microfixação de Complemento, no entanto, as amostras de soro sanguíneo e fígado apresentaram reação cruzada para toxinas tipos C e D, sendo portanto considerados positivos.

Os resultados obtidos por Tokarnia et al. (1970) através da detecção de cultivos de *C. botulinum* produtores de toxinas C e D, em diferentes materiais biológicos colhidos no Estado do Piauí durante surtos de botulismo em bovinos, condizem com os achados do presente trabalho, onde foi verificado que realmente as duas toxinas estão envolvidas com surtos da doença no Brasil.

Baseado nos resultados obtidos pela utilização da Microfixação de Complemento em materiais colhidos de bovinos com diagnóstico clínico de botulismo, o teste demonstrou ter uma excelente eficácia na detecção de toxinas C e D, quando utilizado como referência o Bioensaio em camundongo. Pelo menos 1 dos materiais examinados de cada um dos 23 casos naturais da doença foi positivo no teste, confirmando o diagnóstico do botulismo para a "doença da vaca caída".

Agradecimentos. - Aos Drs. Ivan Valadão Rosa e Ivo Cesar Martins, Embrapa-CNPGC, Campo Grande, MS, e ao Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola (IICA), Brasília, DF, por intercederem e possibilitarem a vinda do Dr. H.-E. Weiss ao Brasil. Ao "Staatens Serum Institut" de Copenhagen, Dinamarca, pela cessão de antitoxinas botulínicas, e ao Dr. K. Gessler, Diretor do "Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt" de Heidelberg, República Federal da Alemanha, pelo apoio dado.

REFERÊNCIAS

- Aalvik B., Sakaguchi G. & Riemann H. 1973. Detection of type E botulinum toxin in cultures by fluorescent-antibody microscopy. *Appl. Microbiol.* 25:153-154.
- Boroff D.A. & Schu-Chen G. 1973. Radioimmunoassay for type A toxin of *Clostridium botulinum*. *Appl. Microbiol.* 25:545-549.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H., Langenegger J. & Dutra I.S. 1992. Epizootic Botulism of cattle in Brazil. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 99:188-190.
- MestrAndrea L.W. 1974. Rapid detection of *Clostridium botulinum* toxin by capillary tube diffusion. *Appl. Microbiol.* 27:1017-1022.
- Noack M. & Schliesser T. 1986. Nachweis von *Clostridium botulinum* Toxin unter Verwendung des Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Systems. Tagung der Fachgruppe Bakteriologie der DVG, Schloss Rauschholzhausen bei Marburg, Alemanha, 4-6. Juni, S. 156-160.
- Oguma K., Muryama S., Syuto B., Iida H. & Kubo S. 1984. Analysis of antigenicity of *Clostridium botulinum* type C1, and D toxins by polyclonal and monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 43(2):584-588.
- Sakaguchi G., Sakaguchi S., Kozaki S., Sugii S. & Ohishi I. 1974. Cross reaction in reversed passive hemagglutination between *Clostridium botulinum* type A and B toxins and its avoidance by the use of antitoxin component immunoglobulin isolated by affinity chromatography. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 27:161-172.
- Shone C., Smith P.W., Appleton N., Hambleton P., Modi N., Gatley S. & Melling J. 1985. Monoclonal antibodies-based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is comparable to the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(1):63-67.
- Silva D.A.O., Souza M.A., Henares Beicher A.M.A. Mineo J. R., Ferreira F.A., Coelho H.E., & Bastos J.E.D. 1991. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de toxina botulínica tipo D. *Pesq. Vet. Bras.* 11(1/2):13-16.
- Smith L.D. 1977. Botulismo. El microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Ed. Acribia, Zaragoza (España). 213p.
- Thomas R.J. 1991. Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. *Aust. Vet. J.* 68(3):111-113.
- Tokarnia C.H., Langenegger J., Langenegger C.H. & Carvalho E.V. 1970. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 5:465-472.
- Weiss H.-E. & Weiss H. 1988. Nachweis von *Clostridium botulinum*-Toxin mittels Mikro-Wärme-Komplement-Bindungsreaktion. *Tierärztl. Umschau* 43:117-126.
- Weiss H.-E., Rademacher G., Doll K. & Dirksen G. 1990. Schnelldiagnose des Botulismus beim Rind mittels Mikro-Wärme-Komplement-Bindungsreaktion. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 97:398-400.