

ISSN 0100-736X

Volume 11 Números 1/2  
Jan/Jun 1991

# 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.*

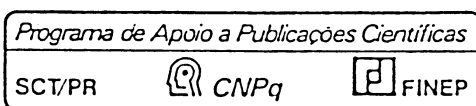
#### *Corpo Editorial (Editorial Board)*

**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, Francisco Megale, 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, Embrapa - Saúde Animal, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851 (Brasil); Tel. (021) 682-1081 e 682-1082; Telex 21-32723 EBPA BR; Fax (021) 682-1230.



A Revista conta com a colaboração  
da Embrapa-MARA e UFRRJ-MEC

Figura da capa: Favas do “barbatimão” (*Stryphnodendron coriaceum* Benth.), árvore das chapadas do Nordeste, que causam intoxicação de bovinos na época de seca. (Tokarnia et al., p. 25)

*Cover illustration: Pods of the “barbatimão” tree (Stryphnodendron coriaceum Benth.), which cause poisoning of cattle during the dry season in northeastern Brazil. (Tokarnia et al., p. 25)*

## 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 corridamente; 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 corridamente 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.

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)

# 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 11

Janeiro/Junho 1991

Números 1/2

## SUMÁRIO

Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> em caprinos, <i>C.H. Langenegger &amp; J. Langenegger</i> . . . . .	1-7
Intoxicação experimental por <i>Brunfelsia pauciflora</i> (Solanaceae) em bovinos. <i>C.H. Tokarnia, A. Gava, L. Stolf &amp; P.V. Peixoto</i> . . . . .	9-12
Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de toxina botulínica tipo D. <i>D.A.O. Silva, M.A. Sousa, A.M.A.H. Beicher, J.R. Mineo, F.A. Ferreira, H.E. Coelho &amp; J.E.D. Bastos</i> . . . . .	13-16
Fotossensibilização em bovinos causada por <i>Ammi majus</i> (Umbelliferae) no Rio Grande do Sul. <i>M.C. Méndez, F. Riet-Correa, A.L. Schild, J.L. Ferreira &amp; M.A. Pimentel</i> . . . . .	17-19
Tratamento massal da tuberculose bovina com isoniazida. <i>J. Langenegger, M.I. Cavalcante &amp; A.D. Lira</i> . . . . .	21-23
Intoxicação experimental por <i>Stryphnodendron coriaceum</i> (Leg. Mimosoideae) em bovinos. <i>C.H. Tokarnia, P.V. Peixoto, A. Gava &amp; J. Döbereiner</i> . . . . .	25-29
Prevalência e diagnóstico comparativo da linfadenite caseosa em caprinos do Estado do Rio de Janeiro. <i>C.H. Langenegger, J. Langenegger &amp; P.O. Scherer</i> . . . . .	31-34
Intoxicação experimental por <i>Cassia occidentalis</i> (Leg. Caes.) em eqüinos. <i>L. F. Irigoyen, D.L. Graça &amp; C.S.L. Barros</i> . . . . .	35-44

## CONTENTS

Serologic and allergic monitoring of experimental infections in goats by <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> . <i>C.H. Langenegger &amp; J. Langenegger</i> . . . . .	1-7
Experimental poisoning in cattle by <i>Brunfelsia pauciflora</i> (Solanaceae). <i>C.H. Tokarnia, A. Gava, L. Stolf &amp; P.V. Peixoto</i> . . . . .	9-12
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of botulinum type D toxin. <i>D.A.O. Silva, M.A. Sousa, A.M.A.H. Beicher, J.R. Mineo, F.A. Ferreira, H.E. Coelho &amp; J.E.D. Bastos</i> . . . . .	13-16
Photosensitization in cattle caused by <i>Ammi majus</i> (Umbelliferae) in southern Brazil. <i>M.C. Méndez, F. Riet-Correa, A.L. Schild, J.L. Ferreira &amp; M.A. Pimentel</i> . . . . .	17-19
Massal treatment of bovine tuberculosis with isoniazid. <i>J. Langenegger, M.I. Cavalcante &amp; A.D. Lira</i> . . . . .	21-23
Experimental poisoning of cattle by <i>Stryphnodendron coriaceum</i> (Leg. Mimosoideae) pods. <i>C.H. Tokarnia, P.V. Peixoto, A. Gava &amp; J. Döbereiner</i> . . . . .	25-29
Prevalence and comparative diagnosis of caseous lymphadenitis in goats from Rio de Janeiro State. <i>C.H. Langenegger, J. Langenegger &amp; P.O. Scherer</i> . . . . .	31-34
Experimental poisoning by <i>Cassia occidentalis</i> (Leg. Caes.) in horses. <i>L.F. Irigoyen, D.L. Graça &amp; C.S.L. Barros</i> . . . . .	35-44

## EDITORIAL

A revista "Pesquisa Veterinária Brasileira" preenche, cada vez mais, o seu papel para completar o processo da geração de conhecimentos em Saúde Animal. Toda a pesquisa somente é válida com publicação dos resultados. Porém, a revista científica não é simplesmente um repositório de trabalhos realizados; ela tem uma função muito mais importante. Através de sua Assessoria Científica contribui, em grau elevado, ao nível da própria pesquisa, através da orientação e pelas exigências que faz.

JÜRGEN DÖBEREINER  
Editor

Para a **assinatura da revista**, ou a obtenção de volumes anteriores, queira enviar um cheque cruzado em nome da "Revista Pesquisa Veterinária Brasileira", no valor de Cr\$ 1.200,00, por volume (ano).

Fascículos avulsos, inclusive anteriores, podem ser adquiridos pelo preço unitário de Cr\$ 600,00.

Remeta o seu cheque, junto com a indicação dos Volumes e/ou Números desejados e o seu endereço, à *Revista Pesquisa Veterinária Brasileira, Embrapa - Saúde Animal, 23851 Seropédica, RJ.*

Se estiver inserido na revista um carnê do Banco Bradesco, utilize-o.

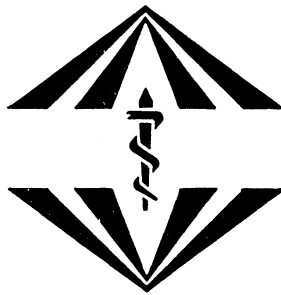
43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Rio de Janeiro, RJ, 14-19.7.1991  
(Informações: SBPC, Rua Costa Carvalho 222, São Paulo, SP 05429; Tel. (011) 211-5008, 211-0933; Telex 11-81681  
SBCH; Fax (011) 212-1376)

VII Congresso Brasileiro de Toxicologia, Niterói, RJ, 19-25.10.1991

(Secretaria Executiva: Rua do Passeio 70, Sobreloja, Lapa, 20021 Rio de Janeiro, RJ; Tel. (021) 297-0066 Ramal 115)

XXIV WORLD VETERINARY  
CONGRESS

18/23 AUGUST 1991 RIO DE JANEIRO/BRAZIL



XXIV CONGRESSO MUNDIAL DE  
VETERINÁRIA

18/23 AGOSTO 1991 RIO DE JANEIRO/BRAZIL

Esse Congresso Mundial de Veterinária será o primeiro a realizar-se no Continente Sul-americano. Trata-se de um dos eventos científicos mais antigos do mundo, cuja série ininterrupta iniciou-se em 1863, em Hamburgo, Alemanha.

Durante o Congresso haverá duas conferências muito importantes (inaugural e de encerramento), três sessões plenárias, 27 simpósios, 140 sessões científicas para comunicações curtas, várias sessões de painéis ("posters") e visitas técnicas a instituições de ensino e pesquisa do Rio de Janeiro. A Secretaria do Congresso recebeu mais de mil Resumos de comunicações científicas, de um total de 91 países, incluindo o Brasil que estará representado por numerosos trabalhos a serem apresentados.



Secretariat: CONGREX DO BRASIL Rua do Ouvidor, 60 Grupo 414 CEP 20040 Rio de Janeiro Brasil Phone: (021) 224-6080 Telex (21)32891 CERT-BR FAX (021)231-1492

## CNPq escolhe ganhadores do Prêmio José Reis 1990

A Comissão Julgadora, composta de representantes da comunidade científica e da Imprensa, escolheu os ganhadores do Prêmio José Reis de Divulgação Científica referente a 1990. O Prêmio, criado e mantido pelo CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, reconhece o trabalho de jornalistas, instituições e pesquisadores que se destacam na tarefa de divulgar para o público leigo aspectos da Ciência e Tecnologia.

Na *modalidade jornalismo*, o ganhador foi Ricardo Bonalume Neto, repórter do Jornal Folha de São Paulo, integrante da equipe do Caderno Ciência. Bonalume Neto é também editor da Revista Novaciência e correspondente no Brasil para a seção de notícias da revista científica Nature, editada na Inglaterra.

Na *modalidade instituição*, o Prêmio José Reis foi concedido à Revista Superinteressante, da Editora Abril.

Na *modalidade divulgação científica*, a ganhadora é Virginia Torres Schall, pesquisadora do Departamento de Biologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). Ao lado de sua atuação como cientista, Virginia escreveu seis livros de literatura infantil entre 1984 e 1990.

### *Prêmio homenageia decano da divulgação científica no Brasil*

O Prêmio José Reis de Divulgação Científica foi criado em 1978 pelo CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Ao dar ao Prêmio o nome de José Reis a intenção foi homenagear aquele que é considerado o decano da divulgação científica no Brasil, o cientista e jornalista José Reis que mantém, há 42 anos ininterruptos, uma seção semanal sobre ciência no Jornal Folha de S. Paulo.

A partir de 1982 o Prêmio José Reis passou a ser concedido anualmente. Desde 1983, há premiação em três modalidades. Em Divulgação Científica concorrem cientistas, pesquisadores e divulgadores da ciência. A modalidade Jornalismo Científico só permite a participação de jornalistas profissionais. Na modalidade Instituição podem concorrer organismos como museus, centros de pesquisa e, também, veículos de comunicação.

A intenção do Prêmio é incentivar e reconhecer o trabalho realizado no sentido de fazer chegar ao público mais amplo possível informações sobre aspectos da Ciência e da Tecnologia.

## MONITORAMENTO SOROLÓGICO E ALÉRGICO DA INFECÇÃO POR *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CAPRINOS<sup>1</sup>

CHARLOTTE H. LANGENEGGER<sup>2</sup> e JEROME LANGENEGGER<sup>2</sup>

**ABSTRACT.**- Langenegger C.H. & Langenegger J. 1991. [Serologic and allergic monitoring of experimental infections in goats by *Corynebacterium pseudotuberculosis*.] Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 11(1/2):1-7. Embrapa-UAPNPSA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851, Brazil.

The six month serologic and allergic monitoring of 26 experimentally infected goats, by intradermic inoculation of 5, 20 and 100 *Corynebacterium pseudotuberculosis* cells, showed the development of both humoral and cellular immune responses at the same time. Only one goat did not develop antibodies, but showed a strong allergic reaction, during 22 weeks post-infection. The antibodies, investigated by the synergistic hemolysis inhibition test (Knight 1978), were first detected at the 3rd week and were most elevated at the 7th week post-infection. In 8 animals the antitoxins were persistent until the 29th week; in 7 animals the antibodies could not be detected between the 12th and the 24th week and in other 9 goats between the 5th and 8th week post-infection. Three animals did not show antibodies in any phase after the infection. The allergic reaction, evaluated by the lymphadenization test (Langenegger et al. 1987) in six-week intervals, showed the highest value between the 4th and the 6th week post-infection and then decreased slowly, following generally the antibody level. One third of the infected goats lost the antitoxin titre and the allergic reaction at the 9th and 10th week, having selfcures. A gradual decrease of the antitoxins titre and the allergic sensitization was observed until the total disappearance in some goats with chronic lymphnode abscesses which did not ulcerate, despite live *C. pseudotuberculosis* still being in the lesion.

**INDEX TERMS:** Caseous lymphadenitis, goats, serologic and allergic monitoring.

**SINOPSE.**- O monitoramento sorológico e alérgico de 26 caprinos infectados experimentalmente por inoculação intradérmica de 5, 20 e 100 bactérias de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, durante 6 meses, revelou que as respostas imunológicas humoral e celular desenvolveram-se paralelamente, exceto em um animal no qual não foram detectadas antitoxinas, porém forte reação alérgica até a 22ª semana pós-infecção. A pesquisa de antitoxinas feita através da técnica da Inibição da Hemólise Sinérgica (Knight 1978), revelou a presença de anticorpos a partir da 3ª e atingiu maior concentração na 7ª semana pós-infecção. Em 8 animais a presença destas persistiu até a 29ª semana; em 7 desapareceu entre a 12ª e 24ª e em 9 entre a 5ª e 8ª semana. Três animais não reagiram com título igual ou superior à diluição 1:20. A linfadenização (Langenegger et al. 1987), feita em intervalos de 6 semanas, revelou reações maiores entre a 4ª e 6ª semana pós-infecção. Depois a sensibilidade alérgica decrescia, pouco a pouco, acompanhando grosseiramente o declínio do nível das antitoxinas. Em um terço dos animais houve autocuras a julgar pela regressão total das antitoxinas e perda da sensibilidade alérgica a partir da 9ª e 10ª semana pós-infecção. Em alguns caprinos cujas lesões gan-

gionares se tornavam crônicas sem ulcerar, observou-se também progressiva regressão, tanto das antitoxinas quanto da reação alérgica, até o seu desaparecimento, apesar da presença de *C. pseudotuberculosis* na lesão.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Linfadenite caseosa, caprinos, monitoramento sorológico e alérgico.

### INTRODUÇÃO

O pouco conhecimento sobre a patogenia da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* dificultou, por muito tempo, a correta interpretação dos resultados das provas sorológicas e alérgicas no diagnóstico da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos. Isto, por sua vez, estimulou a busca de várias novas técnicas de diagnóstico laboratorial, a partir da década de 1940.

Entre os testes sorológicos, visando detectar a presença de antitoxinas no soro de animais infectados, foi utilizada a soro-neutralização através do teste em animais. Carne (1940) fez uso do teste cutâneo em ovinos cuja reação local, provocada pela inoculação de toxina de *C. pseudotuberculosis*, era neutralizada caso houvesse antitoxinas no soro a ser testado. Doty et al. (1964) desenvolveram o teste da inibição da necrose em coelho e Zaki

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 6 de abril de 1989.

Trabalho desenvolvido com recursos financeiros do Programa de Biotecnologia da Finep através do convênio com a Embrapa.

<sup>2</sup> Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal (UAPNPSA), Embrapa, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851.

& Abdel-Hamid (1974) mostraram a viabilidade do teste de proteção do camundongo.

Entre as primeiras provas laboratoriais *in vitro* consta a soro-aglutinação ensaiada por Cameron & McOmie (1940) e que posteriormente foi aperfeiçoada por Awad (1960), Kestintepe (1976), Burrell (1978), Shigidi (1979) e Lund et al. (1982).

Paralelamente foram utilizadas e adaptadas várias outras técnicas de diagnóstico. Shigidi (1974), Burrell (1980b) e Nain et al. (1984) procuraram adaptar o teste da imunodifusão em gel; Shigidi (1978, 1979) utilizou o teste da hemaglutinação indireta (passiva) e a fixação de complemento e Burrell (1980a) ensaiou o teste da inibição da hemólise em tubo.

Por outro lado, surgiram algumas técnicas originais. Zaki (1968), baseando-se em pesquisas anteriores nas quais fora demonstrado que a toxina de *C. pseudotuberculosis* inibia o efeito hemolizante da beta-lisina estafilocócica, desenvolveu o teste de inibição da anti-beta-lisina para o diagnóstico da linfadenite caseosa. Posteriormente, Knight (1978), baseando-se no efeito sinérgico do filtrado de cultura de *Corynebacterium equi* sobre a hemólise causada pela toxina de *C. pseudotuberculosis*, desenvolveu o teste da inibição da hemólise sinérgica em placas de ágar sangue para o diagnóstico da linfadenite ulcerosa dos eqüinos. Lund et al. (1982), Almeida et al. (1983) e Brown et al. (1986) aplicaram o teste no diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos e ovinos.

Mais recentemente surgiram os trabalhos de Shen et al. (1982), Maki et al. (1985) e Johnson et al. (1987) mostrando o emprego do teste de ELISA no diagnóstico da linfadenite caseosa.

Por sua vez, a imunidade mediada por células foi tentada no diagnóstico alérgico da linfadenite caseosa desde a década de 1930 por Cassamagnaghi (1931), Carne (1932), Cameron & McOmie (1940) e Farid & Mahmod (1960/61) utilizando-se de alérgenos elaborados a base de filtrados de culturas de *C. pseudotuberculosis*. Costa Filho (1977/78) ensaiou um teste alérgico em caprinos portadores de lesões da linfadenite caseosa com uma sensitição preparada com suspensão de cultura bacteriana fenolada de *C. pseudo-tuberculosis* e de *C. pyogenes*. Renshaw et al. (1979) e Brown et al. (1985) elaboraram um alérgeno a partir de bactérias desintegradas por sonicação. Langenegger et al. (1987) prepararam uma sensitição com proteína hidrossolúvel extraída de bactérias lavadas de *C. pseudotuberculosis*.

A avaliação comparativa de técnicas de diagnóstico revelou resultados pouco conclusivos. Hamid & Zaki (1973) observaram que o teste da inibição da anti-beta-hemolisina estafilocócica e o teste da proteção do camundongo deram resultados muito semelhantes, mas foram realizados em apenas 5 cabras experimentalmente infectadas. Shigidi (1978, 1979) verificou que o teste de anti-beta-hemolisina estafilocócica era menos sensível do que a hemaglutinação indireta. Obteve ainda resultados discordantes entre os testes de soro-aglutinação, fixação de

complemento e difusão em gel realizados no mesmo grupo de animais. Burrell (1980b, 1981) comparou os testes da inibição da hemólise em tubo com a difusão em gel, revelando bons resultados. Lund et al. (1982) utilizando-se da soro-aglutinação e da inibição da hemólise sinérgica obteve alta correlação no resultado dos dois testes. Maki et al. (1985) ensaiando o teste de ELISA comparou-o com o da inibição da anti-beta-hemolisina estafilocócica e verificou que o teste de ELISA foi ligeiramente mais sensível.

O monitoramento sorológico da infecção experimental com *C. pseudotuberculosis* realizado por Hamid & Zaki (1973) em 5 cabras com teste da inibição da anti-beta-hemolisina revelou a presença de anticorpos a partir da 5ª semana, permanecendo com altos títulos até a 22ª. No teste da proteção do camundongo a presença de anticorpos, neutralizando a toxina já foi observada na 4ª, mantendo-se também até a 22ª semana pós-infecção. Shigidi (1979) testando paralelamente 5 técnicas com o soro de 9 ovinos infectados por escarificação com *C. pseudotuberculosis* observou que na soro-aglutinação 8 dos 9 animais apresentaram aglutininas da 3ª a 7ª semana e destes 4 continuaram reagindo até a 18ª semana. Um animal nunca reagiu. No teste da fixação de complemento a resposta imunológica foi a mais precoce mas também a mais efêmera, ou seja a partir da 1ª até a 8ª semana. Três dos 9 animais não reagiram. Na prova da imunodifusão em gel, 7 ovinos reagiram entre a 7ª e a 13ª semana e 3 destes mantiveram a reação até a 27ª semana. Neste experimento 2 dos 3 ovinos testemunhos apresentaram reações inespecíficas entre a 5ª e a 27ª semana. No teste da inibição da anti-beta-hemolisina apenas 3 dos 9 soros revelaram a presença de anticorpos entre a 9ª e a 20ª semana. No teste da hemaglutinação indireta, reagiram 6 dos 9 animais, dos quais 3 iniciaram na 4ª semana e os outros 3 passaram a reagir após a 12ª semana em diante. Cinco destes animais permaneceram reagentes até a 27ª semana pós-infecção.

Não houve registro de monitoramento alérgico em caprinos ou ovinos infectados por *C. pseudotuberculosis*.

Considerando-se que poucos testes sorológicos e alérgicos para o diagnóstico da linfadenite caseosa dos caprinos e ovinos foram criteriosamente avaliados, julgou-se oportuno monitorar comparativamente a resposta imunológica de caprinos infectados experimentalmente com pequeno número de *C. pseudotuberculosis* através dos testes da inibição de hemólise sinérgica (Knight 1978) e o teste alérgico com a linfadenina (Langenegger et al. 1987).

## MATERIAL E MÉTODOS

O monitoramento sorológico e alérgico foi realizado em 26 caprinos experimentalmente infectados com 5, 20 e 100 bactérias de *C. pseudotuberculosis*<sup>3</sup>, por via intradérmica, na fossa lombar,

<sup>3</sup> Amostra recentemente isolada de abscesso de caprino.

próximo ao linfonodo pré-femural, cuja evolução assemelhou-se a da infecção natural (Langenegger & Langenegger 1988).

Os caprinos foram infectados em épocas diferentes e mantidos em grupos de 6, 8 e 12 animais, em piquetes anteriormente livres da linfadenite caseosa.

O acompanhamento sorológico foi feito pelo teste da inibição da hemólise sinérgica (Knight 1978) para a pesquisa de antitoxinas. Foram colhidas amostras de sangue, semanalmente até a 13ª semana e depois com 2 ou 3 semanas de intervalo até a 29ª pós-infecção.

A monitoração da imunidade mediada por células foi realizada de 6 em 6 semanas, iniciando-se os testes alérgicos entre a 4ª e a 6ª semana após a infecção. Foi utilizada a linfadenização descrita por Langenegger et al. (1987).

*Descrição do teste da inibição da hemólise sinérgica*

O teste foi realizado em placas de Petri de 20 x 200mm contendo ágar sangue de bovino, cujas hemácias foram previamente sensibilizadas com filtrado de *C. equi*<sup>4</sup>. Sobre o meio de cultura colocam-se os discos de papel de filtro embebidos em diluições de soro suspeito misturado com a toxina de *C. pseudotuberculosis* titulada. A presença de antitoxinas no soro a testar será evidenciada pela inibição da hemólise no meio de cultura. No diagnóstico de rotina utilizou-se as diluições de soro de 1:20 a 1:1280.

*Preparo de filtrado de C. equi.* Foi cultivada a amostra de *C. equi* em meio de caldo-coração-cérebro, a 37° C, durante 5 dias. A cultura assim obtida foi centrifugada a 3.000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante, após passagem por milipore de 0,22 µm, constituiu-se no filtrado sensibilizante pronto para o uso.

*Sensibilização das hemácias com filtrado de C. equi.* Glóbulos vermelhos de bovino foram lavados 3 vezes em salina e depois reconstituído ao volume original com a mesma solução. Ao ágar fundido e mantido a 48° C acrescentando-se 20% do filtrado da cultrua de *C. equi* e, após homogeneização, adicionou-se 7% das hemácias lavadas que foram bem misturadas no ágar. Processou-se assim o contacto das hemácias do meio com o filtrado sensibilizante.

*Produção e titulação da toxina de C. pseudotuberculosis.* Foi utilizada a amostra nº 303 de *C. pseudotuberculosis* cultivada em meio de caldo cérebro-coração, a 37° C, durante 3 dias, sendo agitada duas vezes por dia. Após centrifugação da cultura a 3.000 rpm, filtrou-se o sobrenadante em milipore de 0,22 µm e acrescentou-se mertiolato em concentração final de 1:10.000. A toxina contida no filtrado foi titulada, através de diluições desta em

de hemólise variáveis com a concentração da toxina. Foi considerado como adequado para o teste a diluição que formou um halo entre 1 e 2 mm. A toxina concentrada pode ser mantida na geladeira durante 6 meses.

*Descrição do teste da linfadenização*

Foi utilizada como alérgeno a "linfadenina" contendo 0,25 mg/ml de proteína hidrossolúvel (Langenegger et al. 1987), em dose de 0,1 ml. A linfadenização foi realizada por via i.d., na região do omoplata, em área previamente depilada de cerca de 4 x 4 cm. Após a mensuração da espessura da dobra da pele com cutímetro<sup>5</sup> o alérgeno foi inoculado no centro da área depilada com seringa<sup>6</sup>. A leitura foi feita 48 horas após com nova mensuração da pele e avaliação do edema e dor local. Ausência de reação ou aumento da espessura da dobra da pele (AEDP) até 1 mm era considerado negativo; reações com AEDP entre 1 a 1,4 mm eram consideradas suspeitas e reações com AEDP iguais ou superiores a 1,5 mm foram consideradas como positivas.

RESULTADOS

O monitoramento sorológico através da pesquisa semanal de antitoxinas pelo teste da Inibição da Hemólise Sinérgica (IHS) em 24 caprinos infectados experimentalmente por via intradérmica com 5, 20 e 100 germes de *C. pseudotuberculosis* revelou que as primeiras reações positivas (29,1%), com títulos variando de 1:20 a 1:160, manifestaram-se na 3ª semana pós-infecção e que na 7ª semana ocorreram os níveis mais altos de antitoxinas, envolvendo 91,6% dos animais, com títulos de 1:20 a 1:1280. Os níveis e persistência das antitoxinas variaram muito. Um grupo de 8 caprinos manteve altos níveis de antitoxinas por mais de 29 semanas variando os títulos máximos de 1:80 a 1:1280. Outro grupo de 7 animais que apresentaram títulos máximos entre 1:80 e 1:160, deixaram de reagir entre a 12ª e 24ª semana, e, um 3º grupo de animais, infectado nas mesmas condições dos anteriores, apresentou anticorpos com títulos muito baixos e apenas transitariamente, nas primeiras 5 e 8 semanas, conforme mostram os Quadros 1, 2 e 3. A resposta sorológica ao teste da IHS, do conjunto de todos os animais infectados e dos 3 grupos, separadamente, está registrada graficamente na Fig. 1.

Quadro 1. Resposta sorológica de 8 caprinos mostrando altos e persistentes níveis de antitoxinas no sangue, avaliados pelo teste da IHS

Caprino nº	Semana após infecção experimental																		
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	17	19	22	24	26	29
21 <sup>a</sup>	0	80	160	320	640	320	160	160	160	160	160	160	160	80a	80a	80	80	40	40
23	0	0	40	160	160	320	160	80	80	80	80	80	20	40	40	20	40	40	40
26	0	0	20	40	40	80	80	80	160	160	80	80	160	180	80	80	160	80	160
27	0	80	40	80	160	160	320	320	320	320	320	160	160	640	1280	1280	1280	1280	1280
30 <sup>a</sup>	0	20	20	160	160	320	160	160	160	160	1280	1280	1280	640	640	160a	160a	160	160
31	0	0	0	80	1280	640	640	320	320	160	160	80	160	40	80	80	80	80	80
CP	0	0	0	320	320	1280	1280	320	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160
04	0	0	0	20	20	40	40	40	80	80	80	40	20	20	20	40	80	80	40
Média	0	22,5	35,0	147,5	347,5	395,0	355,0	185,0	180,0	160,0	165,0	255,0	265,0	222,5	298,7	242,5	252,5	230,3	242,5

<sup>a</sup> Abscesso no linfonodo.

série em placas de Plexi-Glass. Por meio de discos embebidos em cada diluição e coocados sobre o ágar-sangue formaram-se halos

<sup>4</sup> Amostra isolada de material de diagnóstico.

<sup>5</sup> Federkutimeter (Cutímetro de Mola) H. Hauptner (Catálogo nº 33865). Endereço: Kuller Str. 38144, D-565 Solingen, RFA.

<sup>6</sup> "Syntena" - Ampullen-Tuberkulinspritze (Seringa de tuberculina para carpule) H. Hauptner (Catálogo nº 33890).

Quadro 2. Grupo de caprinos com títulos médios de anitoxinas que deixaram de reagir entre a 12ª e a 24ª semana ao teste de IHS

Caprino nº	Semanas após infecção experimental																		
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	17	19	22	24	26	29
396a	0	0	0	0	0	20	80	80	160	160	160	160	160	0 <sup>a</sup>	0	40	0	0	0
369	0	0	0	20	20	20	20	40	20	20	40	40	80	80	40	40	40	0	0
385	0	160	80	160	80	160	160	80	80	80	80	40	80	20	20	40	0	0	
370a	0	80	40	40	40	40	20	40	20	20 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	
022	0	0	0	20	20	160	80	40	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0	
010a	0	0	20	20	20	20	20	20	20	160	20	0	0	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	
003a	0	0	0	0	20	20	40	40	80	80	40	0	0	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	
Média	0	34,2	20,0	37,1	28,5	62,8	60,0	48,5	60,0	77,1	48,5	34,2	45,7	14,2	8,5	14,2	11,4	0,0	0,0

<sup>a</sup> Abscesso no linfonodo.

Quadro 3. Grupo de animais infectados que apresentaram apenas pequena e transitória resposta sorológica

Caprino nº	Semanas após infecção experimental																		
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	17	19	22	24	26	29
367	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
371	0	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
388	0	0	20	20	40	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
025 <sup>a</sup>	0	0	0	20	40	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0	0	0
029	0	20	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CB	0	0	0	0	20	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
366 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
006	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
007	0	0	0	0	0	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0	4,4	6,6	8,8	13,3	15,5	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<sup>a</sup> Abscesso no linfonodo.

O monitoramento alérgico através do teste intradérmico com a linfadenina descrita por Langenegger et al. (1987) realizado paralelamente nos mesmos animais, porém com intervalos de 6 semanas, acompanhou grosseiramente o resultado do teste de IHS.

Face ao pequeno número de animais em experimentação não pode ser determinado o início do aparecimento

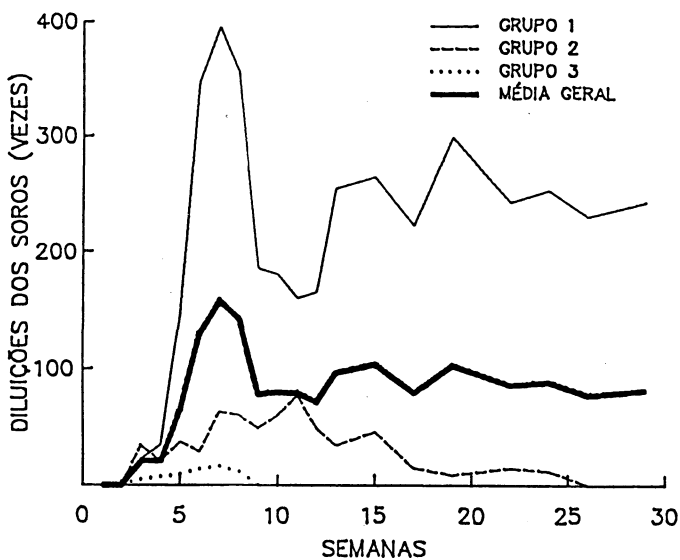


Fig. 1. Monitoramento sorológico pelo teste IHS, mostrando a média geral da resposta imunológica dos 24 caprinos infectados e a média de cada um dos três grupos.

da reação alérgica. Os testes realizados na 4ª e 6ª semana pós-infecção mostraram que neste período houve maior sensibilização alérgica, antecedendo um pouco do pique do teste sorológico que ocorreu na 7ª semana. A partir da 10ª e 12ª semana a reação alérgica decresceu acentuadamente, mas mantendo-se positiva (reações acima de 1,5 mm) até a 22ª e 24ª semana no grupo dos 8 caprinos, até a 16ª e 18ª no segundo grupo, enquanto no 3º apenas 3 dos 9 caprinos ainda reagiram positivamente na 10ª e 12ª semana. Os Quadros 4, 5 e 6 ilustram estes achados. Na Fig. 2 estão apresentados graficamente a reação alérgica dos 24 caprinos e dos 3 grupos que entre si tiveram, como no teste de IHS, comportamento distinto. Início, pico, título máximo e final da resposta imunológica estão resumidos no Quadro 7.

Quadro 4. Resposta ao teste alérgico do grupo de caprinos com altos e persistentes títulos sorológicos

Caprino nº	Período em semanas				
	4-6 (mm)	10-12 (mm)	6-18 (mm)	22-24 (mm)	28-30 (mm)
021 <sup>a</sup>	7,0	5,5	4,0 <sup>a</sup>	4,8	2,0
023	3,2	0,7	1,0	1,8	0,5
026	9,6	2,2	3,4	1,8	1,5
027	2,6	2,5	1,5	2,3	0,2
030 <sup>a</sup>	4,1	3,4	4,0	4,1 <sup>a</sup>	0,5
031	6,0	1,3	1,0	1,1	0,5
CP	8,3	2,4	2,5	3,1	0,3
04	3,6	4,8	4,5	2,0	2,6
Média	5,5	2,8	2,7	2,5	1,0

<sup>a</sup> Abscesso no linfonodo.

Quadro 5. Resposta ao teste alérgico do grupo de caprinos com títulos sorológicos médios

Caprino nº	Período em semanas				
	4-6 (mm)	10-12 (mm)	6-18 (mm)	22-24 (mm)	28-30 (mm)
396a	9,0	6,2	3,3a	2,3	2,5
369	6,0	3,4	3,0	2,5	-
385	10,0	3,4	1,3	0,5	-
370a	7,3	1,2a	0,6	2,0	2,1
022	2,8	0,8	3,1	2,9	1,3
010a	7,9	4,0	1,9a	-	-
003a	7,8	6,3	8,0a	-	-
Média	7,2	3,6	3,0	1,4	0,8

a Abscesso no linfonodo.

Quadro 6. Resposta ao teste alérgico do grupo de caprinos com títulos sorológicos efêmeros

Caprino nº	Período em semanas				
	4-6 (mm)	10-12 (mm)	6-18 (mm)	22-24 (mm)	28-30 (mm)
367	4,0	1,3	0,9	1,0	-
371	2,0	1,0	0,4	0,3	-
388	6,0	0,7	0,2	0,0	-
025a	4,0	1,4	1,0	1,6a	0,5
029	2,5	0,4	0,8	0,7	1,3
CB	2,7	1,8	2,2	2,1	0,8
366a	2,9	5,3a	3,5	3,0	3,0
006	2,0	1,2	1,0	-	-
007	3,0	1,9	1,8	1,8	2,4
Média	3,2	1,6	1,3	1,1	0,8

a Abscesso no linfonodo.

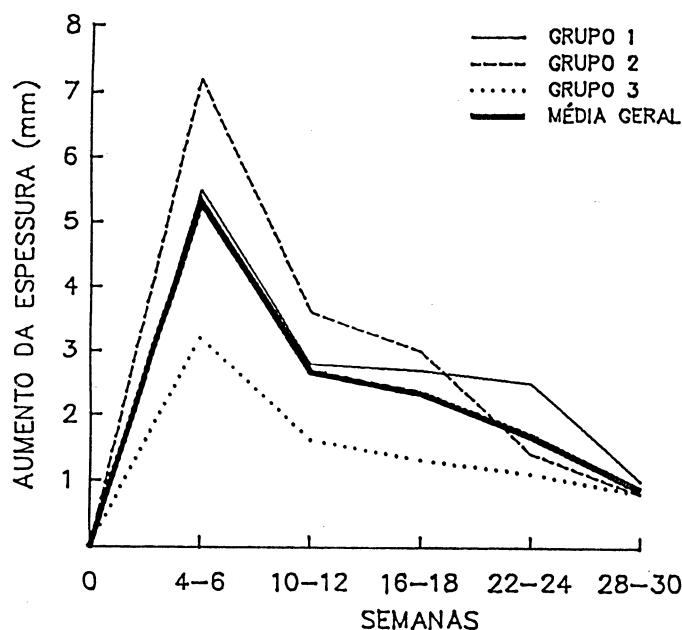


Fig. 2. Monitoramento alérgico pelo teste da linfadenização dos mesmos animais e dos mesmos grupos. As reações alérgicas são mais homogêneas do que as sorológicas.

Em 4 dos 8 casos de infecção que evoluíram para a forma clínica, já não havia mais a presença de antitoxinas no período em que os abscessos ulceraram (n<sup>os</sup> 370, 010, 003 e 025). Desconhece-se o mecanismo que provocaria esta queda e desaparecimento do nível de antitoxinas no

Quadro 7. Início, pico e fim da resposta imunológica avaliado pelo IHS e pelo teste alérgico

Caprino nº	Nível de antitoxina				Reação alérgica			
	Início	Pico	Título <sup>a</sup>	Final	Início <sup>b</sup>	Pico	AEDP (mm) <sup>a</sup>	Final
021	3 <sup>c</sup>	6 <sup>c</sup>	1:640	29 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>	7,0	29 <sup>c</sup>
023	4	7	1:320	29	5	5	3,2	22
026	4	10	1:60	29	5	5	9,6	29
027	3	22	1:1280	29	5	5	2,6	22
030	3	12	1:1280	29	5	5	4,1	29
031	5	6	1:1280	29	5	5	6,0	5
CP	5	7	1:1280	29	5	5	8,3	22
004	5	10	1:80	29	5	10	4,8	29
396	7	11	1:160	22	6	6	9,6	28
369	5	15	1:80	24	5	5	6,0	24
385	3	3	1:160	24	5	5	10,0	11
370	3	3	1:180	11	5	5	7,3	28
022	5	7	1:160	11	5	16	3,1	22
010	4	11	1:160	12	5	5	7,9	18
003	6	10	1:80	12	4	16	8,0	16
367	5	5	1:20	5	5	5	4,0	5
371	3	3	1:20	4	5	5	2,0	5
388	4	6	1:40	8	5	5	6,0	5
025	5	6	1:40	8	5	5	4,0	5
029	3	4	1:20	7	5	5	2,5	5
CB	6	7	1:40	8	5	5	2,7	22
006	4	4	1:20	4	5	5	2,0	5
007	7	7	1:20	8	4	4	3,0	29
366	-	-	-	-	6	10	5,3	29
001	-	-	-	-	-	-	-	-
028	-	-	-	-	-	-	-	-

a Títulos e aumentos maiores de cada caprino.

b Não foram feitos testes alérgicos em semanas anteriores.

c Referência em semanas pós-infecção.

soro sanguíneo. A medida que se desenvolve a cápsula fibrosa do abscesso, esta parece impedir a passagem de toxina para o organismo do animal.

O monitoramento alérgico, feito nos mesmos animais porém com intervalos maiores, mostrou uma estreita correlação com a presença de antitoxinas no soro sanguíneo, no entanto, em alguns casos os 2 testes se complementaram. Observou-se que nos caprinos n<sup>os</sup> 023 e 031, cujos títulos de antitoxinas persistiram até a 29<sup>a</sup> semana, a reação alérgica já era negativa na 10<sup>a</sup> (Quadros 1 e 4), ao contrário, o caprino, n<sup>o</sup> 366 manteve-se com reação positiva até a 24<sup>a</sup> semana sem apresentar antitoxinas no sangue (Quadros 3 e 6). Verificou-se ainda que o teste alérgico apresentou reações proporcionalmente maiores no grupo dos animais com os menores títulos de antitoxina (Quadros 3 e 6) e que, por ocasião da maturação dos abscessos dos 8 caprinos que evoluíram para a forma clínica, o teste alérgico ainda apresentava reações positivas em todos os animais, enquanto no sorológico apenas 4 animais ainda reagiram.

## DISCUSSÃO

Baseado nos resultados da infecção experimental de caprinos indenes com pequeno número de *C. pseudotuberculosis*, Langenegger & Langenegger (1988) deduziram que nas infecções naturais apenas cerca de um terço evolue para a doença clínica com abscedações de linfonodos e que nas demais infecções sobrevém a cura espontânea. O monitoramento sorológico e alérgico destes mesmos animais mostrou que a resposta imunológica, avaliada pelo nível de antitoxinas no soro sanguíneo e pela sensibilidade cutânea, coincidiu apenas parcialmente com a evolução clínica da linfadenite caseosa. Assim num grupo de 8 animais que apresentou os maiores e mais persistentes títulos de antitoxinas (Quadro 1) apenas 2, os caprinos n<sup>os</sup> 021 e 030, desenvolveram abscessos. No grupo de 7 animais (Quadro 2) com títulos e persistência média, a infecção evoluiu para doença clínica em 4 destes. Num terceiro grupo de 9 animais (Quadro 3) com apenas pequena e fugaz presença de antitoxinas houve também dois caprinos, os de n<sup>os</sup> 025 e 366 que apresentaram abscessos. O caprino n<sup>o</sup> 366 não revelou antitoxina em nenhuma fase da infecção, no entanto, apresentou reação alérgica positiva até a 24<sup>a</sup> semana. Observou-se também que os níveis mais altos de antitoxinas no sangue sempre antecederam em muito a maturação dos abscessos.

Diante deste comportamento imunológico avaliado pelas antitoxinas e reações alérgicas desenvolvidas no decurso da infecção experimental concluiu-se que os testes de IHS e da linfadenização, separadamente, permitem detectar, precocemente, a infecção por *C. pseudotuberculosis*, mas que os mesmos complementam-se mais satisfatoriamente no reconhecimento de animais com infecções, atingindo alto índice de sensibilidade e especificidade.

Como em apenas um terço das infecções por *C. pseudotuberculosis* houve evolução para a forma clínica da

linfadenite caseosa, a sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico não podem ser avaliados em função da presença ou não de lesões clínicas, pois como também demonstrou o monitoramento sorológico e alérgico houve, simultaneamente, respostas imunológicas humoral e mediada por células na fase pré-clínica e ainda, durante períodos variáveis, houve níveis de antitoxinas e sensibilidade alérgica em animais que, pouco a pouco, apresentaram auto-curas sem passar pela fase clínica de abscedação de linfonodos. O monitoramento mostrou ainda ter havido variações, às vezes bem acentuadas, destas respostas imunitárias de um animal para outro. Esta situação permitiu concluir que o uso do IHS e o teste da linfadenização se complementaram e obtiveram assim um alto nível de sensibilidade e especificidade diagnóstica.

O uso dos dois testes individualmente ou combinados, tem-se mostrado muito práticos na vigilância sanitária de rebanhos indenes e na separação dos animais sadios dos infectados em rebanhos com linfadenite caseosa. No entanto, os mesmos testes e, presumivelmente, quaisquer outros, tem limitações, pois não permitem separar os animais reagentes cujas infecções venham evoluir para a forma clínica das que passam para a autocura, a não ser pelo monitoramento por cerca de 6 meses.

Em rebanhos infectados a situação se torna ainda mais complexa se não forem separados os animais portadores de abscessos externos, clinicamente evidentes, pois com a rotura destes ocorrem reinfeções em diversas épocas, o que força o prolongamento do monitoramento por muito tempo, além dos 6 meses.

Diante disso, no saneamento de um rebanho torna-se imperioso separar e isolar sistematicamente os animais portadores de abscessos em linfonodos externos através do exame clínico semanal, pois a rotura de um linfonodo reativa a infecção no rebanho e conseqüentemente a resposta imunitária.

*Agradecimentos.* - Os autores querem registrar seus agradecimentos ao Técnico de Laboratório Sr. Orlandino José Gregório, ao Laboratorista III Sr. José Enéias Barbosa e ao Laboratorista I Sr. Marildo de Azevedo pela efetiva e dedicada colaboração técnica prestada na realização da presente pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- Almeida M.C., Sawyer M. & Sawyer J. 1983. Utilização do teste de inibição da hemólise sinérgica na pesquisa de antitoxina contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. Congr. Lat. Am. Microbiol. 9:212.
- Awad F.J. 1960. Serological investigation of pseudotuberculosis in sheep. I. Agglutination test. Am. J. Vet. Res. 81:251-253.
- Brown C.C., Olander H.J., Biberstein E.L. & Moreno D. 1985. Serologic response and lesion produced in goats experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis* of caprine and equine origin. Am. J. Vet. Res. 46:2322-2326.
- Brown C.C., Olander H.J., Zometa C. & Alves S.F. 1986. Serodiagnosis of inapparent caseous lymphadenitis in goats and sheep, using the synergistic hemolysis-inhibition test. Am. J. Vet. Res. 47:1461-1463.
- Burrell D.H. 1978. Non-specific agglutination of *C. ovis* by precolostral and young lamb sera. Res. Vet. Sci. 25:373-375.
- Burrell D.H. 1980a. A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. Res. Vet. Sci. 28:190-194.

- Burrell D.H. 1980b. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *C. ovis* antitoxin. Res. Vet. Sci. 28:234-237.
- Burrell D.H. 1981. Caseous lymphadenitis in goats. Aust. Vet. J. 57:105-110.
- Cameron H.S. & McOmie W.A. 1940. The agglutination reaction in *Corynebacterium ovis* infection. Cornell Vet. 30:41-46.
- Carne H.R. 1932. The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagents. Aust. Vet. J. 8:42-47.
- Carne H.R. 1940. The toxin of *Corynebacterium ovis*. J. Path. Bact. 51:199-212.
- Cassamagnaghi A. 1931. Le diagnostic de la lympho-adenite caseuse des moutons par l'intradermo-reaction a la Preisz-Nocardine. Bull. Acad. Vet. France 4:330-333.
- Costa Filho G.A. 1977/78. Diagnóstico precoce da linfadenite caseosa dos caprinos através da intradermo-reação. Anais Univ. Fed. Rural Pernambuco 2/3:161-170.
- Doty R.B., Dunne H.W., Hokanson J.F. & Reid J.J. 1964. A comparison of toxins produced by various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the development of a diagnostic skin test for caseous lymphadenitis of sheep and goats. Amer. J. Vet. Res. 25:1679-1685.
- Farid A. & Mahmoud A.H. 1960/61. Primary trials on the diagnosis of caseous lymphadenitis in Egypt by means of intradermal inoculation of allergic material. Vet. Med. J., Giza, 7:253-258.
- Hamid Y.M.A. & Zaki M.M. 1973. Immune response of goats artificially infected with *C. ovis*. J. Egyptian Vet. Med. Ass. 33:137-140.
- Johnson E.H., Oliveira S.C., Ribeiro O.C. & Silva J.A. 1987. Serological detection of abscesses caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* using the DIG-ELISA. Proc. IV Int. Conf. Goats, Brasilia, p. 1358.
- Kestintepe H. 1976. Stabilization of *Corynebacterium ovis* antigens for serum agglutination test. Firat Univ. Vet. Fak., Dergisi, 3:84-93.
- Knight H.D. 1978. A serologic method for the detection of *C. pseudotuberculosis* infections in horses. Cornell Vet. 68:220-237.
- Langenegger C.H., Langenegger J. & Costa S.G. 1987. Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. Pesq. Vet. Bras. 7(2):27-32.
- Langenegger J. & Langenegger, C.H. 1988. Reprodução da linfadenite caseosa em caprinos com pequeno número de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Pesq. Vet. Bras. 8(1/2):23-26.
- Lund A., Almlid T., Larsen H.J. & Steine T. 1982. Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in adult goats from a naturally infected herd. Acta Vet. Scand. 23:473-482.
- Maki L.R., Shen S., Bergstrom R.C. & Stetzenbach L.D. 1985. Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep using an enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res. 46:212-214.
- Nain S.P.S., Garg D.N. & Chandiramani N.K. 1984. An agar-gel-immunoprecipitation test for the detection of *Corynebacterium ovis* antibodies in sheep and goats sera. Indian J. Comp. Microbiol. Infect. Dis. 5:93-96.
- Renshaw H.W., Graft V.P. & Gates N.L. 1979. Visceral caseous lymphadenitis in the thin ewe syndrome. Isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus* and *Moraxella* spp. from internal abscesses in emaciated ewes Am. J. Vet. Res. 40:1110-1114.
- Shen D.T., Jen L.W. & Gorham J.R. 1982. The detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antibody in goats by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Proc. 3rd Int. Conf. Goat Prod. Dis., Tucson, Arizona, p. 445-448.
- Shigidi M.T.A. 1974. Antigenic relationship of various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Bull. Epizootic Dis. Africa 22:263-269.
- Shigidi M.T.A. 1978. An indirect haemagglutination test for the serodiagnosis of *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Res. Vet. Sci. 24:57-60.
- Shigidi M.T.A. 1979. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Brit. Vet. J. 135:172-177.
- Zaki M.M. 1968. The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection. Res. Vet. Sci. 9:489-493.
- Zaki M.M. & Abdel-Hamid Y.M. 1974. A comparative study of *in vitro* and *in vivo* tests for caseous lymphadenitis. Res. Vet. Sci. 16:167-170.

## INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Brunfelsia pauciflora* (Solanaceae) EM BOVINOS<sup>1</sup>

CARLOS HUBINGER TOKARNIA<sup>2</sup>, ALDO GAVA<sup>3</sup>, LUIZ STOLF<sup>3</sup> e PAULO VARGAS PEIXOTO<sup>4</sup>

**ABSTRACT.**- Tokarnia C.H., Gava A., Stolf L. & Peixoto P.V. 1991. [Experimental poisoning in cattle by *Brunfelsia pauciflora* (Solanaceae).] Intoxicação experimental por *Brunfelsia pauciflora* (Solanaceae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 11(1/2):9-12. Dept<sup>o</sup> Nutrição Animal, Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, RJ 23851, and Centro Agroveterinário, Universidade para o Desenvolvimento de Santa Catarina, Av. Luiz de Camões, Lages, SC 88500, Brazil.

Plant poisoning was suspected as a cause of the so called "swollen-brisket-disease" (a disease characterized by edema of the brisket) which occurs in certain areas of the State of Santa Catarina, Southern Brazil. In order to establish the etiology of this disease, *Brunfelsia pauciflora* (Cham. et Schlecht.) Benth. (of the Solanaceae family) was fed experimentally to cattle, as it is found in large quantities in the pastures where the disease occurs. The plant was given in the fresh or dried stage, in single or repeated administrations to 11 bovines. All but one experimental animal showed symptoms of poisoning; none died due to the ingestion of the plant. The symptoms always seen in experimental poisoning by *B. pauciflora*, was mainly nervous excitement. This was very uniform, but varied in intensity. Symptoms included playing with the tongue, chewing movements, salivation, restlessness, stretching and shaking of the hindlegs, excitability and muscular tremors, sometimes with sudden contractions, lack of stability and the animal sometimes falling to the ground. Four animals had epileptic seizures. Loss of appetite and weight and liquid feces, also occurred. In the experiments with single doses, the symptoms were observed during 4 to 9 days, in the last third of which being less intense. In the experiments with repeated doses, symptoms grew less intense with time until they disappeared. They only reappeared or intensified on rainy days, later during the experiment not even then. Postmortem and histopathological examinations showed no lesions in 6 slaughtered experimental animals.

The nervous symptoms seen in experimental poisoning by *B. pauciflora* are very different from those seen in the "swollen brisket disease", which are of cardiac origin.

**INDEX TERMS:** Poisonous plants, *Brunfelsia pauciflora*; Solanaceae, cattle, "swollen brisket disease", pathology.

**SINOPSE.**- Com a finalidade de esclarecer a causa da "doença-do-peito-inchado" (enfermidade que ocorre em certas regiões de Santa Catarina e que cursa com edemas da região esternal), diversas plantas foram submetidas à experimentação em bovinos e, entre elas, *Brunfelsia pauciflora* (Cham. et Schlecht.) Benth. (fam. Solanaceae), pois havia coincidência de seu habitat com os pastos onde ocorre a maior incidência da doença e por neles essa planta ser abundante. A planta revelou-se tóxica, tanto em doses únicas como repetidas, em estado fresco ou dessecado, porém não causou a morte de nenhum dos 10 bovinos que mostraram sinais clínicos. Os sintomas observados na intoxicação experimental por *B. pauciflora* eram principalmente de natureza nervosa, muito uniformes, somente variando em intensidade. Constatou-se movimentação atípica da língua, movimentos de mastigação, sia-

lorréia, o animal elevava continuamente as pernas como que sapateando, esticando uma ou outra perna para traz, sacudindo-a, hiperexcitação, tremores musculares, por vezes acompanhados de contrações súbitas, desequilíbrio e, por vezes, quedas. Quatro animais tiveram, adicionalmente, ataques epileptiformes. Havia ainda diminuição de apetite, emagrecimento e fezes líquidas. Nos experimentos de administrações únicas os sintomas foram observados durante 4 a 9 dias, diminuindo em intensidade no terço final. Nos experimentos de administrações repetidas, com o passar dos dias, a intensidade dos sintomas foi diminuindo até desaparecer, só havendo exacerbação ou reaparecimento em dias de chuva e, posteriormente, nem nessas condições. À necropsia e ao exame histológico não foram encontradas alterações dignas de nota em 6 animais sacrificados.

Desta maneira, fica evidente que *B. pauciflora* não é responsável pela "doença-do-peito-inchado". A sintomatologia nervosa que ocorreu na intoxicação experimental por *B. pauciflora* difere grandemente dos sintomas de origem cardíaca, observados na "doença-do-peito-inchado".

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Plantas tóxicas, *Brunfelsia pauciflora*, Solanaceae, bovinos, "doença-do-peito-inchado", patologia.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 24 de abril de 1989.

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

<sup>3</sup> Universidade para o Desenvolvimento de Santa Catarina, Centro Agroveterinário, Av. Luiz de Camões 2090, Lages, SC 88500.

<sup>4</sup> Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97119 Santa Maria, RS.

## INTRODUÇÃO

Os estudos sobre a “doença-do-peito-inchado” (doença de bovinos que cursa com edema da região esternal) no Estado de Santa Catarina, levaram a crer que pudesse se tratar de intoxicação crônica por planta (Tokarnia et al. 1989).

Percorrendo os pastos de fazendas nas quais ocorria o problema e, para comparação, também os pastos de fazendas indenes, duas plantas chamaram inicialmente nossa atenção, tanto pela coincidência de seus habitats com os pastos onde ocorria a maior incidência da doença, como por neles serem abundantes: *Brunfelsia pauciflora* e *Senecio desiderabilis*. Por esta razão, foram as duas primeiras plantas submetidas à experimentação mais detalhada em bovinos. *S. desiderabilis* revelou-se tóxica, (Tokarnia et al. 1990), porém produziu um quadro clínico-patológico diferente do observado na “doença-do-peito-inchado”.

O presente estudo foi realizado para verificar se *B. pauciflora* é tóxica para bovinos e, em caso positivo, para comparar o quadro clínico-patológico experimental produzido, com o da “doença-do-peito-inchado”.

## MATERIAL E MÉTODOS

As folhas do arbusto *Brunfelsia pauciflora* (fam. Solanaceae)<sup>5</sup>, colhidas no município de Urubici, Santa Catarina (reg. Döb/Tok 1754, RB 286519) (Fig. 1), foram administradas a 11 bovinos, incluindo bezerros desmamados e bovinos adultos. Oito experimentos com administrações únicas e repetidas foram feitos com a



Fig. 1. *Brunfelsia pauciflora* (Cham. et Schlecht.) Benth. (fam. Solanaceae) no município de Urubici, Santa Catarina.

planta dessecada à sombra e 3 outros com administrações repetidas da planta fresca, que, nesses últimos experimentos, era colhida quinzenalmente e guardada em refrigerador.

<sup>5</sup> *Brunfelsia pauciflora* (Cham. et Schlecht. Benth. in DC. Prodr. 10:199, 1846; in Reitz, Flora Illustrada Catarinense, fasc. Sola.: 299, 1966.

Arbusto de 1–2 m de altura; folhas de obovado-oblongas a elípticas, com 10–25 cm x 4–7 cm, membranáceas. Flores poucas, de 1–5, com pedicelos de 12–20 mm de compr. Cálice tubuloso, de 15–25 mm de compr.; corola tubulosa, de roxa, azul a branca.

Em relação a planta dessecada, 3 bovinos a receberam em doses únicas, 2 a receberam diariamente durante 8 e 60 dias, respectivamente, e 3 outros bovinos a receberam diariamente, com algumas interrupções, durante pouco mais que 16 meses.

Em relação a planta fresca, 3 bovinos a receberam diariamente; um durante 6 dias, os outros dois, com algumas interrupções, durante 291 e 160 dias, respectivamente. O animal que recebeu a planta fresca durante 6 dias, morreu no 7º dia do experimento, de causa intercorrente. Devido a problemas alheios a nossa vontade, o prosseguimento dos experimentos com a planta fresca nos 2 outros bovinos ficou prejudicado após os períodos acima indicados. Desta maneira, são apresentados em relação a esses 2 bovinos que ingeriram a planta fresca, somente os dados relativos ao quadro clínico-patológico por eles apresentados nesses períodos.

Tanto nos experimentos com a planta dessecada como nos com a planta fresca, esta era administrada por via oral, isto é, colocada manualmente na boca dos animais.

Os animais experimentais eram observados durante grande parte do dia e eram realizados exames clínicos de acordo com a evolução e a intensidade do quadro de intoxicação. Os animais eram pesados mensalmente; nos experimentos de longa duração com administrações repetidas, quando havia diferença que chegasse a 5 kg, reajustava-se a quantidade da planta a ser administrada.

Os experimentos com os 8 bovinos que receberam a planta dessecada, foram realizados nas instalações da Embrapa, Km 47, RJ. Esses eram mantidos em boxes individuais, recebendo sempre a mesma alimentação, constituída de forragem verde picada, composta principalmente de capim-guatemala (*Tripsacum fasciculatum* Trin.), capim-angola (*Brachiaria mutica* (Forsk.) Stapf.), e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), bem como, diariamente, 1 kg de ração concentrada para bovinos e água a vontade. Aproximadamente das 7:30 às 10:30h os animais ficavam em um curral sem cobertura, expostos ao sol. Diariamente eram movimentados durante 15 minutos.

Os experimentos com os 3 bovinos que receberam a planta fresca, foram realizados no Centro Agroveterinário de Lages, SC. Estes foram mantidos constantemente em um piquete com pastagem constituída de quicuiu (*Pennisetum clandestinum*) e trevo branco (*Trifolium repens*); eram recolhidos diariamente somente para a administração da planta.

Nos experimentos com a planta dessecada, após os animais terem sido sacrificados por choqueamento e sangria, fazia-se a necropsia, complementada por exames histopatológicos. Os fragmentos de tecido foram incluídos em parafina e corados pela hematoxilina-eosina. Do coração coletavam-se fragmentos dos ventrículos direito e esquerdo, através de cortes transversais, à altura de 1/3, 1/2 e 3/4 do coração. O cérebro e cerebelo eram fixados integralmente em formol a 10%, e somente após alguns dias retiravam-se fragmentos de diversas porções através de cortes transversais, isto é, à altura do núcleo caudado, do corno de Ammon e tálamo, do mesencéfalo, do cerebelo e do bulbo.

## RESULTADOS

No Quadro 1 estão esquematizados os principais dados de todos os experimentos realizados com *B. pauciflora* em bovinos.

Verifica-se que, com exceção de um (Bov. 4821), todos os animais adoeceram, tanto os que receberam a planta dessecada ou fresca, como os que a receberam em

Quadro I. Intoxicação experimental por *Brunfelsia pauciflora* (planta dessecada ou fresca) em bovinos

Bovino				Planta administrada					Sintomas			
Nº (reg. SAP)	Peso em kg			Período de administração	Dose diária g/kg <sup>a</sup>	Nº de administrações	Período da administração em dias	Dose total adm. g/kg <sup>a</sup>	Data coleta	Dia do exp. em que foram observados os 1ºs sintomas	Manifestações	Desfecho
	1º dia adm.	Último dia adm.	Dia da morte									
<i>Experimentos com a planta dessecada</i>												
4451	180	-	-	10.4.85	20	1	1	20	III/85	1º (5h 25 min. após adm.)	Sintomas nervosos acentuados com 2 ataques epiléptiformes observados no 4º dia do experimento. Evolução: 9 dias	Animal ficou em observação até 12.2.87. Não foi sacrificado.
4723 (24234-37)	173	-	417,5	9.5.85	20	1	1	20	"	1º (7 1/2 h após adm.)	Sintomas nervosos acentuados com 2 ataques epiléptiformes observados no 3º e 4º dias do exp. Evolução: 7 dias	Animal foi sacr. em 30.5.87
4724	131	-	-	9.5.85	10	1	1	10	"	1º (6h.40 min. após adm.)	Sintomas nervosos moderados. Evolução: 4 dias	Animal ficou em observação até 7.8.86. Não foi sacr.
4726 (24215-17)	115	-	418	18.4-25.4.85	5	8	8	40	"	3º	Sintomas nervosos acentuados até 3 dias após o término da administr., com 2 ataques epiléptiformes no 5º e 6º dias do exp. Evolução: 9 dias	Animal foi sacr. em 2.5.87
4749 (23579-88)	134	-	132,5	14.6-12.8.85	2,5	60	60	150	"	2º (17h após adm.)	Sintomas nervosos moderados durante a 1ª semana, leves durante a 2ª semana, depois só discretos com exceção de sintomas moderados no 41º, 44º e 51º dias (dias de chuva)	Animal foi sacr. em 13.8.85
4821 (24665-68)	97	188	245	25.4-4.9.86 5.9-1.12.86 5.12.86-9.1.87 14.1-20.2.87 27.3-26.4.87 31.5-5.8.87 6.8.-4.9.87	1,25	420	Aprox. 16 meses com 4 interrupções no total de 74 dias	525	10.3.86 25.7.86 24.11.86 dez. 86 fev. 87 mar. 87 out. 85	-	Nunca mostrou sintomas de intoxicação	Animal foi sacr. em 15.10.88
4814 (24675-78)	86	160	215	25.4.-4.9.86 5.9-1.12.86 5.12.86-9.1.87 14.1-20.2.87 27.3- 6.4.87 31.5-5.8.87 6.8.-4.9.87	2,5	420	Aprox. 16 meses com 4 interr. no total de 73 dias	1050	10.3.86 25.7.86 24.11.86 dez. 86 fev. 87 mar. 87 out. 85	5º	Nos primeiros 8 meses do exp. mostrava sintomas nervosos moderados toda vez que chovia; depois nunca mais mostrou sintomas de intoxicação	Animal foi sacr. em 22.10.88
4824 (24649-52)	143	198	254	25.4.-4.8.86 5.9-1.12.86 5.12-25.12.86 14.1-19.2.87 27.3-26.4.87 31.5-5.8.87 6.8.-4.9.87	5	375	Aprox. 16 meses com 5 interr. no total de 120 dias	1875	10.3.86 25.7.86 24.11.86 dez. 86 fev. 87 mar. 87 out. 85	4º	Durante os 2 primeiros meses do experimento sintomas nervosos acentuados quase contínuos, com ataques epiléptiformes em 13.6.86 e 2.7.86. Em seguida se recuperou em poucos dias, e só teve 2 recaídas em dez. 86 (aos 8 meses do exp.) em dias de chuva, quando mostrou sintomas moderados. Depois nunca mais mostrou sintomas de intoxicação	Animal foi sacr. em 27.8.88
<i>Experimentos com a planta fresca, coletada de 15 em 15 dias e guardada no refrigerador</i>												
Lages 03 (N. 88/87, SAP 2234)	191	-	-	13.7.86-6.5.87 com interr. em 1.11-4.11.86, 5.12.-10.12.86, 26.12.86-15.1.87 e 31.3-2.5.87	5	256	9 meses e 3 semanas com 4 interr. no total de 34 dias	1080	-	3º	Inicialmente sintomas nervosos bastante acentuados, que foram diminuindo de dia a dia, mas havia exacerbação ou reaparecimento dos sintomas quando chovia	Animal observado até 6.5.87
Lages 04 (SAP 1962)	481	-	-	13.7-17.7.86 18.7.86	5 2,5	5 1	6 dias	27,5	-	2º	Sintomas nervosos acentuados a partir de 14.7.86.	Animal morreu em 19.7.86 de causa intercorrente
Lages 05 (N. 67/87 SAP 2204)	-	-	-	23.9.86-3.3.87 com interr. em 1.11-4.11.86, 5.12-10.12.86 e 3.1-15.1.87	1	137	5 meses e 10 dias com 3 interr. no total de 23 dias	137	-	3º	Inicialmente sintomas nervosos bastante acentuados, que foram diminuindo com os dias, mas houve exacerbação ou reaparecimento dos sintomas quando chovia	Animal observado até 3.3.87

<sup>a</sup> Sempre é indicada a dose correspondente à planta fresca.

doses únicas ou repetidas. Nenhum animal morreu em virtude da administração da planta; um animal (Bov. Lages 04) morreu devido a causa intercorrente. Como no histórico consta que os animais adoecem somente após 2 anos de permanência na região, 5 bovinos experimentais foram sacrificados somente após mais que 2 anos desde o início da administração da planta; um animal (Bov. 4749) foi sacrificado no dia seguinte após o término da administração da planta.

Os sintomas observados na intoxicação experimental por *B. pauciflora*, tanto nos experimentos com a planta

dessecada, como fresca, em doses únicas ou repetidas, eram principalmente de natureza nervosa (excitação) e foram muito uniformes, somente variando em intensidade (vide Quadro 1). Constatou-se movimentação atípica da língua, movimentos de mastigação, sialorréia, o animal elevava continuamente as pernas, pisoteando o mesmo lugar, esticando uma ou outra perna para traz, sacudindo-a, hiperexcitação (animal espantado, irrequieto, assustadíssimo, com as orelhas eretas), tremores musculares em certos grupos de músculos ou generalizados, às vezes acompanhados de contrações súbitas, localizadas, ou por todo

corpo. Observou-se ainda andar com as pernas abertas, com elevação e projeção exageradas dos membros para frente, andar desequilibrado, por vezes quedas, dificuldade em deitar devido a instabilidade e permanência em decúbito esterno-abdominal por mais tempo que o normal.

Em 4 dos animais que receberam as dosagens maiores (Bov. 4451 – 20 g/kg x 1; Bov. 4723 – 20 g/kg x 1; Bov. 4726 – 5 g/kg x 8 e Bov. 4824 – 5 g/kg x 375) foram observados 2 ataques epileptiformes em cada um deles. Esses ataques caracterizavam-se por queda brusca do animal ao solo, em decúbito lateral, contrações tônicas de todo corpo, leves tremores generalizados, com ocasionais contrações súbitas generalizadas, forte cerramento das pálpebras, “olho revirado”, mugidos, movimentos de pedalagem; minutos após o animal então se acalmava, ficava em decúbito esterno-abdominal e se levantava. Antes e depois de um ataque epileptiforme os animais mostravam os sintomas de excitação delineados anteriormente, em grau maior ou menor.

Um animal (Bov. 4726), além dos ataques epileptiformes, avançava para cima da parede do biotério, como que quisesse escala-la, durante os 6 últimos dias do experimento (5<sup>o</sup> ao 11<sup>o</sup>), e ainda, às vezes, ficava parado olhando para cima (“olhando estrelas”).

Além dos sintomas nervosos, ainda faziam parte do quadro de intoxicação diminuição do apetite, emagrecimento e fezes líquidas.

Nos experimentos de administrações únicas (10 e 20g/kg) (Bov. 4451, 4723, 4724) os sintomas foram observados durante 4 a 9 dias, diminuindo em intensidade no terço final.

Nos experimentos de administrações repetidas (nos Bov. 4749, 4814, 4824, Lages 03, Lages 05), com o passar dos dias, a intensidade dos sintomas foi diminuindo até estes desaparecerem, só havendo exacerbação ou reaparecimento deles em dias de chuva, e mais adiante, nem nessas condições (vide Quadro 1).

À necropsia, não foram encontradas alterações dignas de nota em nenhum dos 6 animais sacrificados. No Bov. Lages 04, que morreu de causa intercorrente, foi constatado fígado de coloração amarelo acinzentada e coração com hemorragias difusas no epicárdio.

Nos exames histopatológicos dos diversos órgãos e do sistema nervoso central não foram encontradas alterações dignas de nota em nenhum dos 6 bovinos sacrificados. No Bov. Lages 04 observou-se bilestase no fígado.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

*Brunfelsia pauciflora* revelou-se tóxica para bovinos. A sintomatologia nervosa que ocorreu na intoxicação experimental por *B. pauciflora*, difere grandemente dos sintomas observados na “doença-do-peito-inchado”, que são de origem primariamente cardíaca (Tokarnia et al. 1989).

Uma revisão da literatura revela poucos dados em relação a toxidez de *Brunfelsia* spp. para animais.

Hoehne (1939) diz que, para os animais, as brunfelsias

são tidas como tóxicas e que as vítimas apresentam convulsões epileptiformes, inquietude geral e finalmente paralisção do coração, e que na autópsia se verifica acúmulo de sangue coagulado no intestino. Infelizmente não fornece a fonte desses dados.

Braga (1960) relata que, de acordo com informação do Prof. Abreu Matos, jumentos comem avidamente as folhas de um manacá (*Brunfelsia uniflora*) porém ficam embriagados, assustadiços, caindo facilmente e, por vezes, morrem.

Em relação a toxidez do “manacá” para o homem, Braga (1960) informa que a raiz de *B. uniflora*, “empregada pelos índios para produzir uma sorte de delírio furioso ou mesmo loucura persistente, é usada quase como específico contra o reumatismo articular. Em alta dose produz escurecimento da vista, confusão de idéias, delírio inconstante, tremores. . .”

Só encontramos um trabalho experimental com plantas do gênero *Brunfelsia*; trata-se dos experimentos de McBarron & Sarem (1975) em 3 cães, aos quais foram administrados os frutos de *Brunfelsia bonodoro* (*B. latifolia*) nas doses de 1,25, 1,8 e 5,5 g/kg. O que ingeriu a menor quantidade, somente mostrou alguns sinais de incoordenação. Os outros 2 cães mostraram dentro do prazo de 15 a 40 horas após a administração da planta, fezes fluidas, salivação, poliúria, leves tremores musculares e ataques convulsivos, com duração de poucos a 30 minutos. Os animais foram sacrificados e os achados de necropsia e histopatológicos foram praticamente negativos.

Como substâncias ativas tem sido isolados os alcalóides manacina e manacéina (Roth et al. 1984) e o glicosídeo scopoletina (6-methoxy-7-hydroxycoumarin) (Mors & Ribeiro 1957).

Esses dados indicam que *Brunfelsia* spp., tanto nos animais, como no homem, são capazes de produzir intoxicação com sintomatologia nervosa. Entretanto, através de nossos experimentos, fica evidente que essa planta, em virtude de provocar sintomatologia tipicamente nervosa e não produzir quaisquer lesões, não é responsável pela “doença-do-peito-inchado”.

## REFERÊNCIAS

- Braga R. 1960. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 2<sup>a</sup> ed. Imprensa Oficial, Fortaleza.
- Hoehne F.C. 1939. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. Graphica, São Paulo.
- McBarron E.J. & Sarem W. 1975. Poisoning of dogs by the fruits of the garden shrub *Brunfelsia bonodora*. Aust. Vet. J. 51:280.
- Mors W.B. & Ribeiro O. 1957. Occurrence of scopoletin in the genus *Brunfelsia*. J. Organic Chemistry 22:978.
- Roth L., Daunderer M. & Kormann K. 1984. Giftpflanzen – Pflanzengifte, Vorkommen, Wirkung, Therapie. Ecomed, Landsberg-München.
- Tokarnia C.H., Gava A., Peixoto P.V., Stolf L., Consorte L.B. & Döbereiner J. 1990. Intoxicação experimental por *Senecio desiderabilis* (Compositae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 10(1/2):35-42.
- Tokarnia C.H., Gava A., Peixoto P.V., Stolf L. & Moraes S.S. 1989. A “doença do peito inchado” (edema da região esternal) em bovinos no Estado de Santa Catarina. Pesq. Vet. Bras. 9(3/4):73-83.

## ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO D<sup>1</sup>

DEISE A. OLIVEIRA SILVA<sup>2</sup>, MARIA A. SOUSA<sup>2</sup>, ÂNGELA M. A. HENARES BEICHER<sup>3</sup>, JOSÉ ROBERTO MINEO<sup>2</sup>, FERNANDO A. FERREIRA<sup>4</sup>, HUMBERTO E. COELHO<sup>4</sup> e JOSÉ EUGÊNIO D. BASTOS<sup>4</sup>

ABSTRACT. – Silva D.A.O., Souza M.A., Beicher A.M.A.H., Mineo J.R., Ferreira F.A., Coelho H.E. & Bastos J.E.D. 1991. [Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of botulinum type D Toxin.] Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da toxina botulínica tipo D. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 11(1/2):13-16. Depto Ciências Fundamentais Saúde, Univ. Fed. Uberlândia, Cx. Postal 593, Uberlândia, MG 38400, Brazil.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for detection of botulinum type D toxin. The double antibody sandwich ELISA was performed with reference to botulinum type D antitoxin (Statens Serum Institut, Denmark) as in the solid phase, to sensitize plastic surface, as in the production of the immunoenzymatic conjugate. The sensitivity of ELISA was evaluated by using various dilutions of botulinum type D toxin added to liquid culture or a pool of normal bovine serum. The reactivity was, respectively, 15.6 LD<sub>50</sub>/ml and 31.2 LD<sub>50</sub>/ml for mice, with absorbance measured spectrophotometrically at 450 nm using an ELISA microreader. The specificity was demonstrated by the absence of reactivity with botulinum type A, B and E, tetanic and diphtheric toxins. However, botulinum type C toxin indicated a partial cross-reactivity due to comparable common antigenic determinants between type C and D toxins. Considering the results presented in this paper it can be concluded that the assay is particularly useful as a sensitive, fast and efficient screening method for detection of botulinum type D toxin, but it has the same limitations for the direct diagnosis of botulism in cattle as encountered with the bioassay in mice, because of the low concentration of circulating toxin.

INDEX TERMS: Botulism, serologic diagnostic, ELISA.

SINOPSE. – Foi desenvolvido um teste imunoenzimático (ELISA) capaz de detectar toxina botulínica tipo D. A técnica empregada foi a de Duplo Anticorpo (ELISA "Sandwich") utilizando-se antitoxinas botulínicas tipo D de referência (Statens Serum Institut, Dinamarca) tanto na fase de sensibilização das micropilhas de polivinilcloreto como para a produção do conjugado imunoenzimático (antisoro botulínico tipo D ligado à peroxidase). A sensibilidade do teste foi verificada através de titulações de toxina botulínica tipo D em fluidos de cultura e adicionada a "pool" de soro bovino normal, resultando em reatividade correspondendo respectivamente a 15,6 DL<sub>50</sub>/ml e 31,2 DL<sub>50</sub>/ml para camundongos, determinada espectrofotometricamente em leitor de micropilhas. A especificidade, por sua vez, foi demonstrada pela ausência de reatividade com os diferentes tipos de toxinas botulínicas A, B e E, toxinas tetânica e diftérica. Entretanto, foi observado reatividade cruzada parcial com a toxina botulínica tipo C, devido às semelhanças antigênicas entre as toxinas tipos C e D. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que o referido teste pode ser utilizado como um método de triagem, sensível, rápido e eficaz para a detecção de toxina botulínica tipo D, em-

bora, especificamente para o diagnóstico direto do botulismo do bovino, o método tem as mesmas limitações do bioensaio em camundongos por causa da baixa concentração de toxina circulante.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Botulismo, diagnóstico sorológico, ELISA.

### INTRODUÇÃO

O botulismo é uma neuroparalisia causada pela ação de toxinas de natureza proteica produzidas por *Clostridium botulinum*, afetando não somente os seres humanos como também várias outras espécies de mamíferos, aves e peixes (Tokarnia et al. 1970, Schonhofen & Garcia 1981, Delazari & D'Avila 1983, Kelly et al. 1984, Schocken et al. 1985).

Há 8 tipos de toxinas imunologicamente distintas: A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D, E, F e G (Boroff & Das Gupta 1971). Os casos humanos estão geralmente associados aos tipos A, B e E. As toxinas C e D estão comumente associadas ao botulismo animal (Delazari & D'Avila 1983).

No Brasil, os surtos se concentram no gado bovino, principalmente nas regiões de cerrado, tendo sido tipificadas as toxinas botulínicas C e D (Tokarnia et al. 1970, Delazari & D'Avila 1983).

A prova mais convincente no diagnóstico laboratorial

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 2 de maio de 1989.

<sup>2</sup> Laboratório de Imunologia, <sup>3</sup> Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Fundamentais para a Saúde, e <sup>4</sup> Departamento de Medicina Animal, Universidade Federal de Uberlândia, Caixa Postal 593, Uberlândia, MG 38400.

do botulismo baseia-se na detecção da toxina botulínica no soro e em outras amostras biológicas do organismo infectado. Uma das modalidades técnicas para esta detecção consiste de um bioensaio em camundongos, através de soroneutralização da toxina com antisoros específicos (Smith 1977). Este teste mostra-se bastante sensível, permitindo a detecção de níveis de toxina menores que 5 DL<sub>50</sub>/ml em amostras biológicas (Shone et al. 1985). Entretanto, apresenta alguns inconvenientes, como a utilização de grande número de animais de laboratório, demora para obtenção dos resultados, morte inespecífica devido à interferência de outras substâncias que podem ser letais ou influenciar na neutralização das toxinas (Dezfulian & Bartlett 1984).

Recentemente, têm sido desenvolvidos métodos imunológicos "in vitro" para facilitar a identificação dos diferentes tipos de toxinas produzidas por *Cl. botulinum*. Entre eles incluem hemaglutinação (Evancho et al. 1973, Sakaguchi et al. 1974), radioensaio (Boroff & Das Gupta 1971, Ashton et al. 1985) e ELISA (Kosaki et al. 1979, Notermans et al. 1982b, Michalik et al. 1986).

O teste ELISA, apesar da menor sensibilidade que o bioensaio em camundongos, tem apresentado vantagens como técnica alternativa relativamente rápida e realizável, permitindo detectar toxinas mesmo em estado toxicologicamente inativo (Kozaki et al. 1979).

No presente trabalho, o teste ELISA foi padronizado para a detecção de toxina botulínica tipo D em filtrado de cultura e adicionada a amostras de soro bovino normal com finalidade de se utilizar esta técnica para detecção da toxina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Toxinas

As preparações de toxinas botulínicas tipos C e D foram obtidas, respectivamente, de culturas de cepas de *Clostridium botulinum* tipos C e D, provenientes do Laboratório Vallée Nordeste S/A., em meio de Wright por 5 dias a 30°C (Wright 1933). As preparações de toxinas botulínicas tipos A, B e E e toxinas tetânica e diftérica foram fornecidas pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP. A potência da toxina botulínica tipo A era de 8 x 10<sup>4</sup> DL<sub>50</sub>/ml e a toxina diftérica continha 120 Lf/ml.

### Antitoxinas

As antitoxinas botulínicas tipo D (1000UI/ml) produzidas em eqüinos foram obtidas do "Statens Seruminstitut" de Copenhague, Dinamarca. A concentração protéica destes antisoros foi realizada pelo método de Lowry et al. 1951, empregando-se como padrão a albumina humana (Behring 20%) sendo a leitura efetuada em colorímetro Coleman Jr. no comprimento de onda de 660nm.

### Conjugado imunoenzimático

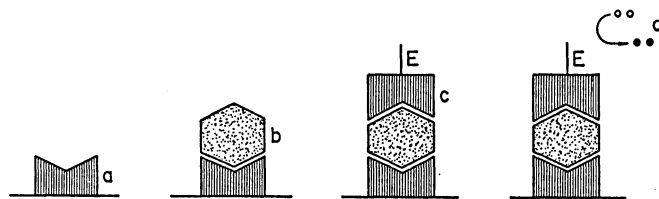
O antisoro botulínico tipo D (Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca) foi ligado quimicamente à enzima peroxidase (Sigma Ch. Co, type VI) segundo o método de Nakane & Kawaoi (1974). O conjugado assim obtido foi adicionado de glicerina neutra (E. Merck, Darmstadt), alíquotado e estocado a -20°C.

### Determinação da atividade enzimática

O substrato utilizado para revelar a atividade enzimática consistiu de uma solução de peróxido de hidrogênio (0,3%) em Tampão Citrato-Fosfato 0,075M, pH = 4,0 contendo Tetrametilbenzidina (TMB) na concentração de 10mg/1ml de Dimetilsulfóxido (DMSO).

### Ensaio imunoenzimático

A técnica empregada para a detecção da toxina botulínica foi a descrita por Notermans et al. (1982b), com modificações como esquematizada na Fig. 1.



- a -  $\lambda$ -eqüina antitoxina D.  
 b - toxina botulínica tipo D.  
 c -  $\lambda$ -eqüina antitoxina D marcada com a enzima peroxidase (E)  
 d - substrato

Fig. 1. Esquema da técnica imunoenzimática (Elisa) de duplo anticorpo.

Microplacas de polivinilcloreto com fundo em U (Hemobag, Campinas, SP) foram sensibilizadas com 100  $\mu$ l de antitoxina botulínica tipo D a uma concentração protéica de 20  $\mu$ g/ml, diluída em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,06M, pH = 9,6. Como controle, foi utilizada gama-globulina eqüina não imune, nas mesmas condições.

Após incubação por uma noite a 4°C, as microplacas foram submetidas a lavagens por três vezes com salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH = 7,2, contendo Tween-20 a 0,05% (PBS-T). Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ l de diferentes diluições de amostras padrão positiva e negativa.

As amostras padrão positiva consistiram de filtrados de cultura contendo toxina botulínica tipo D diluída em PBS adicionado de gelatina a 0,2% (PBS-G) e de "pool" de soro bovino normal adicionado de diferentes diluições do filtrado de cultura. As amostras padrão negativa consistiram dos mesmos diluentes (PBS-G e soro bovino normal) sem a adição de toxina tipo D.

Após incubação por 45 minutos a 37°C, as placas foram submetidas a novas lavagens como anteriormente descrito e incubadas nas mesmas condições com 100  $\mu$ l de antitoxina botulínica tipo D marcada com peroxidase, na diluição de 1/500 em PBS-T.

O excesso do conjugado foi removido por lavagens e adicionando-se em seguida 100  $\mu$ l da solução do substrato enzimático. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, sob agitação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ l de solução 2N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os valores de absorbância foram determinados a 450nm em leitor de microplacas (Sanko, Belo Horizonte, MG).

Os valores de absorbância líquida foram calculados pela diferença entre os dois valores obtidos nas cavidades das microplacas sensibilizadas com a antitoxina botulínica e com a gama-globulina eqüina não-imune (controle).

### Determinação da sensibilidade

Para a determinação da sensibilidade da técnica imunoenzimática, as amostras padrão positiva foram tituladas, na razão 2, a partir de 1000 DL<sub>50</sub>/ml até 1,9 DL<sub>50</sub>/ml, sendo diluídas em PBS-G e adicionadas a "pool" de soro bovino normal.

### Determinação da especificidade

A especificidade da técnica foi determinada utilizando-se filtrados de cultura de toxinas botulínicas tipos A, B, C e E, toxinas tetânica e diftérica.

### Bioensaio em camundongos

A potência das toxinas botulínicas tipos C e D fora determinadas mediante a inoculação do filtrado de cultura em camundongos, segundo Notermans et al. (1982a), determinando-se a DL<sub>50</sub> pelo método de Reed & Muench (1938).

## RESULTADOS

A potência das toxinas botulínicas tipos C e D foi, respectivamente,  $1,4 \times 10^4$  DL<sub>50</sub>/ml e  $4 \times 10^4$  DL<sub>50</sub>/ml, determinada após inoculação intraperitoneal em camundongos.

Nas Figuras 2 e 3, está representada a comparação entre ELISA e Bioensaio em camundongos para a detecção de toxina botulínica. O menor nível de detecção pelo ELISA correspondeu a 15,6 DL<sub>50</sub>/ml quando a toxina foi titulada em filtrado de cultura (Fig. 2) e a 31,2 DL<sub>50</sub>/ml quando adicionada a "pool" de soro bovino normal (Fig. 3).

Quanto à especificidade, nenhuma reação cruzada foi observada com amostras de toxinas botulínicas tipos A, B

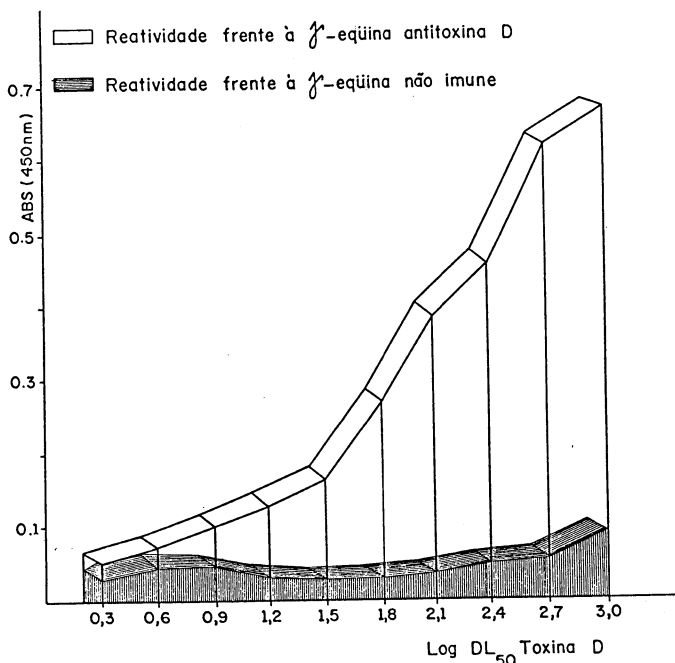


Fig. 2. Determinação da sensibilidade da reação imunoenzimática (ELISA) para detecção de toxina botulínica tipo D em filtrado de cultura.

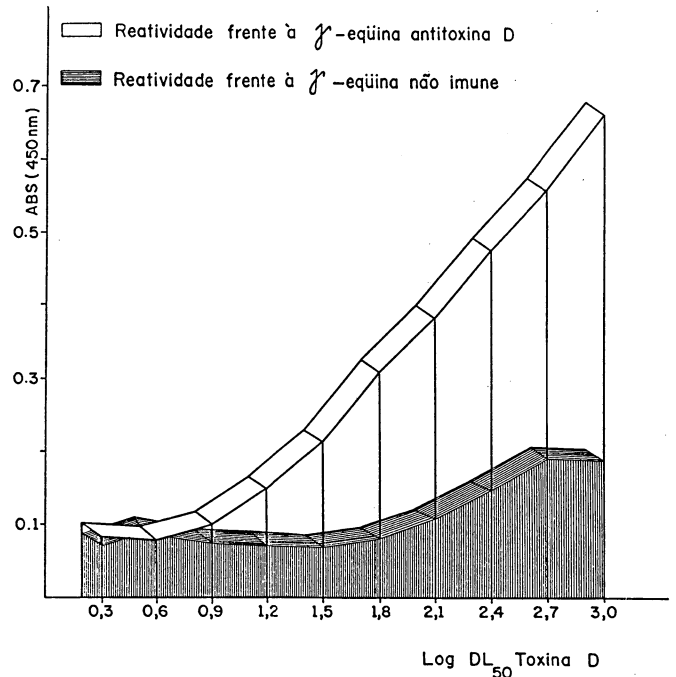


Fig. 3. Determinação da sensibilidade da reação imunoenzimática (ELISA) para detecção de toxina botulínica tipo D adicionada a soro bovino normal.

Quadro 1. Determinação da especificidade da reação imunoenzimática (ELISA) para detecção da toxina botulínica tipo D com amostras de diferentes tipos de toxinas botulínicas, toxinas tetânica e diftérica

Amostras	Toxicidade	ELISA (Valores de absorbância a 450nm)
Toxina botulínica tipo A	$8 \times 10^4$ DL <sub>50</sub> /ml	.000
Toxina botulínica tipo B	ND <sup>a</sup>	.000
Toxina botulínica tipo C	$1,4 \times 10^4$ DL <sub>50</sub> /ml	.231
Toxina botulínica tipo D	$4 \times 10^4$ DL <sub>50</sub> /ml	.567
Toxina botulínica tipo E	ND	.000
Toxina tetânica	ND	.000
Toxina diftérica	120 Lf/ml	.000

<sup>a</sup>ND = não determinada.

e E, toxinas tetânica e diftérica. Entretanto, como demonstrado no Quadro 1, observou-se uma reatividade cruzada parcial com a toxina botulínica tipo C.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Pelos resultados apresentados, torna-se evidente que a toxina botulínica tipo D pode ser detectada pelo ELISA, tanto em fluido de cultura como quando adicionada a soro bovino normal. É um teste relativamente simples, rápido, não requerendo animais de laboratório nem tampouco ativação tríplica das amostras.

Usando-se a técnica de "sandwich", o nível de detecção de toxina botulínica em filtrado de cultura correspondeu a 15,6 DL<sub>50</sub>/ml com uma sensibilidade superior à descrita na literatura (Notermans et al. 1982a). Quando adicionada a soro bovino normal, a sensibilidade foi de 31,2 DL<sub>50</sub>/ml, tornando-se possível a detecção da toxina botulínica em amostras de soro bovino com suspeita clínica de botulismo, sem fatores interferentes.

Nenhuma reação cruzada foi observada com as toxinas botulínicas dos tipos A, B e E, assim como outras toxinas testadas. Entretanto, foi observado reação cruzada com a toxina botulínica tipo C, também verificada por Notermans et al. (1982a). Tal fato pode ser atribuído a que uma mesma cepa de *Clostridium botulinum* pode produzir os dois tipos de toxinas C e D em diferentes concentrações (Ochanda et al. 1984, Oguma et al. 1984) e estas apresentarem determinantes antigênicos em comum (Oguma et al. 1980).

Sendo assim, a diferenciação de toxinas botulínicas tipos C e D em testes imunológicos "in vitro" é dificultada em virtude da complexidade e semelhança antigênica das toxinas produzidas por *Cl. botulinum*.

A especificidade do teste ELISA está altamente relacionada com o antisoro botulínico utilizado (Notermans et al. 1978). Michalik et al. (1986) observaram que antitoxinas botulínicas comerciais contêm anticorpos dirigidos contra vários epítópos, resultando em forte reatividade cruzada entre as toxinas botulínicas tipos A e B, para o teste ELISA. Embora tenham sido empregadas antitoxinas botulínicas de referência (Statens Seruminstitut, Dinamarca) no teste ELISA para detecção de toxina botulínica tipo D, foi observado reatividade cruzada com a toxina botulínica tipo C.

Apesar da confirmação de que a diferenciação entre toxinas botulínicas tipos C e D pelo ELISA foi parcial (Notermans et al. 1982a) isto poderia ser solucionado pela purificação das antitoxinas utilizadas levando a um aumento da especificidade do teste.

Sabe-se que o diagnóstico direto do botulismo em bovinos, baseado na detecção da toxina botulínica, é dificultado devido à baixa concentração da toxina circulante, a não ser em casos superagudos, inclusive pelo clássico bioensaio em camundongos (Langenegger et al. 1987). Desta forma, como método adicional na elucidação do botulismo, o ensaio imunoenzimático descrito poderia ser testado quanto à aplicação para detectar toxina botulínica tipo D em diferentes amostras provenientes de animais com suspeita clínica de botulismo, bem como em filtrados de cultura obtidos das referidas amostras e prováveis fontes de contaminação.

## REFERÊNCIAS

- Ashton A.C., Erowther J.S. & Dolly J.O. 1985. A sensitive and useful radioimmunoassay for neurotoxin and its haemagglutinin complex from *C. botulinum*. *Toxicon* 23(2):235-246.
- Boroff D.A. & Das Gupta B.R. 1971. Botulinum toxin, p. 1-68. In: Kadis S., Montie T.C. & Ajil S.J. (ed.) *Microbiol Toxins*, Vol. 2A. Academic Press, New York.
- Delazari I. & D'Avila Z.S. 1983. Botulismo: ocorrência, diagnóstico e medidas terapêuticas. *Higiene Alimentar* 2(3):132-149.
- Dezfulian M. & Bartlett J.G. 1984. Detection of *Clostridium botulinum* type A toxin by enzyme-linked immunosorbent assay with antibodies produced in immunological tolerant animals. *J. Clin. Microbiol.*, 19(5):645-648.
- Evancho G.M., Ashton D.H., Briskey E.J. & Schantz E.J. 1973. A standardized reversed passive hemagglutination technique for the determination of botulinum toxin. *J. Food. Sci.* 38:764-767.
- Kelly A.P., Jones R.T., Gillick J.C. & Sims L.D. 1984. Outbreak of botulism in horses. *Equine Vet. J.* 16(6):519-521.
- Kozaki S., Dufrenne J., Hagenars A.M. & Notermans S. 1979. Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Clostridium botulinum* type B toxin. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 32:199-205.
- Langenegger J., Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1987. Botulismo epizootico em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 7(1):vii-ix.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Michalik M., Grzybowski J., Ligieja J. & Reiss J. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and differentiation of *Clostridium botulinum* toxins type A and B. *J. Immunol. Methods* 93:225-230.
- Nakane P.K. & Kawaoi A. 1974. Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem.* 22:1084-1091.
- Notermans S., Dufrenne J. & Shothorst M. 1978. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* toxin type A. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 31:81-85.
- Notermans S., Dufrenne J. & Kozaki S. 1982a. 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.
- Notermans S., Hagenars A.M. & Kozaki S. 1982b. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection and determination of *Clostridium botulinum* toxins A, B and E. *Methods in Enzymology* 84:223-239.
- Ochanda J., Syuto B., Oguma K., Iida H. & Kubo S. 1984. Comparison of antigenicity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(6):1319-1322.
- Oguma K., Syuto B., Iida H. & Kubo S. 1980. Antigenic similarity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. *Infect. Immun.* 30:656-660.
- Oguma K., Muryama S., Syuto B., Iida H. & Kubo S. 1984. Analysis of antigenicity of *Clostridium botulinum* type C<sub>1</sub>, and D toxins by polyclonal and monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 43(2):584-588.
- Reed L.J. & Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- 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 use of antitoxic component immunoglobulin isolated by affinity chromatography. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 27:161-172.
- Schocken R.P.I., Ávila F.A., Pinese J.R. & Yokoya F. 1985. An outbreak of type C botulism in broiler chickens in São Paulo State, Brazil. *Revta Microbiol., S. Paulo*, 16(1):31-35.
- Schonhofen C.A. & Garcia R.G.F. 1981. First outbreaks of botulism in wild ducks in Curitiba, PR. *Arq. Biol. Tecnol., Curitiba*, 24(4):433-435.
- 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.
- Smith L.D. 1977. Botulismo. El microorganismo, sus toxinas, la enfermedad. Ed. Acribia, Zaragoza (Espanã), p. 62-80.
- Tokarnia C.H., Langenegger J., Langenegger C.H. & Carvalho E.V. 1970. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 5:465-472.
- Wright H.D. 1933. The importance of adequate reduction of peptone in the preparation of media for pneumococcus and other organisms. *J. Path. Bact.* 37:257.

## FOTOSENSIBILIZAÇÃO EM BOVINOS CAUSADA POR *Ammi majus* (Umbelliferae) NO RIO GRANDE DO SUL<sup>1</sup>

MARIA DEL CARMEN MÉNDEZ<sup>2,3</sup>, FRANKLIN RIET-CORREA<sup>2,3</sup>, ANA LUCIA SCHILD<sup>2,3</sup>, JOÃO LUIZ FERREIRA<sup>2</sup> e MARCELO ALVES PIMENTEL<sup>4</sup>

ABSTRACT. – Méndez M.C., Riet-Correa F., Schild A.L., Ferreira J.L. & Pimentel M.A. 1991. [Photosensitization in cattle caused by *Ammi majus* (Umbelliferae), in Southern Brazil.] Fotossensibilização em bovinos causada por *Ammi majus* (Umbelliferae) no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 11(1/2):17-19. Laboratório Regional de Diagnóstico, Fac. Vet., Univ. Fed. Pelotas, Campus Universitário, Pelotas, RS 96100, Brazil.

An outbreak of primary photosensitization in cattle, grazing on a pasture invaded by *Ammi majus*, in Southern Brazil, is described. The disease occurred during December and January in a herd of 14 cows and 14 calves. Clinical signs were characterized by dermatitis in the udder of the cows and keratoconjunctivitis in the calves. Regression of the lesions was observed after the withdrawal of the animals from the pasture. The disease was reproduced in calves by the administration of *A. majus* seeds at a dosis of 1.7 to 8 g/kg of body weight. The experimental animals showed ocular discharge, oedema of the eyelids, keratitis and dermatitis of the muzzle.

INDEX TERMS: Poisonous plants, plant poisoning, primary photosensitization, *Ammi majus*, Umbelliferae, cattle.

SINOPSE. – Descreve-se um surto de fotossensibilização primária em bovinos no município de Bagé, Rio Grande do Sul, em uma pastagem invadida por *Ammi majus*. A doença ocorreu nos meses de dezembro e janeiro em um grupo de 14 vacas e 14 terneiros da raça Hereford. Os animais apresentaram fotossensibilização, caracterizada por dermatite no úbere das vacas e ceratoconjuntivite nos terneiros, que regrediram após a retirada dos animais da pastagem. A doença foi reproduzida experimentalmente, em 6 terneiros, com sementes de *A. majus*, nas doses de 1,7 a 8 g/kg de peso vivo, observando-se corrimento ocular, edemas das pálpebras, ceratite e dermatite no focinho.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, intoxicação por planta, fotossensibilização primária, *Ammi majus*, Umbelliferae, bovinos.

### INTRODUÇÃO

Fotossensibilização primária associada à ingestão de *Ammi majus* tem sido descrita em bovinos (Egyed et al. 1974b, Alvariza et al. 1975) e em aves (Egyed et al. 1975a, 1976). A doença tem sido reproduzida experimentalmente, com essa espécie, em ruminantes (Dollahite et al. 1978, Witzel et al. 1978, Odriozola 1983) e em aves (Egyed et al. 1974a, 1975c, Shlosberg 1978). Outra espécie, *Ammi visnaga*, também tem sido descrita produzindo fotossensibilização em aves, tanto na sua forma natural como experimental (Trenchi 1960, Egyed et al. 1975b).

O objetivo do presente trabalho é descrever um surto de fotossensibilização em bovinos ocorrido no município de Bagé, Rio Grande do Sul, e apresentar os dados refe-

rentes à reprodução da intoxicação por *Ammi majus* em bovinos.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os dados epidemiológicos e os sinais clínicos foram observados no local do surto.

Para testar a toxicidade da planta, folhas, flores e sementes coletadas após o surto, em janeiro de 1985, foram administradas, em estado fresco pela via bucal a um terneiro Holandês preto e branco em uma única dose de 9,9 g/kg de peso vivo. Sementes colhidas no mesmo local, porém no ano seguinte ao do surto, em janeiro de 1986, foram administradas em estado fresco na dose única de 1,7 g/kg de peso vivo a outro terneiro da raça Holandesa.

Posteriormente, sementes de *Ammi majus*<sup>5</sup> colhidas no município de Pelotas, RS, em janeiro de 1987, e guardadas refrigera-

<sup>5</sup> O material botânico (Pel. nº 8910) foi identificado pelo Eng. Agrº Osvaldo del Puerto, Faculdade de Agronomia, Universidade da República, Uruguai. – Descrição de *Ammi majus* (Mathias M.E., Constance L. & Araújo D. 1972. Flora ilustrada Catarinense. Umbelliferas. Itajaf, Santa Catarina, p. 52-53): Plantas robustas, escabrosas, principalmente na inflorescência, ramificação alterna, anuais, 3-10 dm de altura. Folhas ovais ou pinadas, 5-20 cm de comprimento, 5-15 cm de largura, ternado-pinadas ou pinadas, folíolos lanceolados a oblongos, 1-3 cm de compr., 0,5-2 cm de larg., agudos a obtusos, cuneados, finamente setuloso-serrado, pecíolos 3-12 cm de compr., estreitamente envaginantes; folhas caulinas alternas, bipenadas ou ternado-bipenadas com as divisões principalmente lineares, pecíolos completamente invaginantes.

Umbelas pedunculadas, pedúnculos 8-15 cm de compr., involúcro de 8-12 brácteas trifurcadas, 1-3 (-7) cm de compr., patente-ascendentes a reflexas; raios muito delgados, 20-40 (16-65), 1,5-8 cm de compr., patente-ascendentes; involúcelo de 8-14 bractéolas linear-acuminadas, escariosas na margem, 2-4 (-10) mm de compr., patentes ou reflexas; pedicelos 20-30, 2-5 mm de compr., desiguais, patente-ascendentes. Flores alvas, os pétalos um tanto zigomorfos marginalmente, ovados a obovados, bilobados desigualmente com ápice largo e inflexo quase igual ao limbo; estigmas e estiletos mais longos do que o estilópódio; carpóforo partido quase até a base.

Fruto oblongo, 2 mm de compr., 1,25-1,5 mm de larg.; número de cromossomos n=11.

Nome vulgar: Amio-maior, amio, ami, bisnaga-das-seáras.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 26 de maio de 1989.

<sup>2</sup> Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96100 Pelotas, Rio Grande do Sul.

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

<sup>4</sup> Médico Veterinário, Rua Gal. Osório 1500/404, Secretaria da Saúde, Pelotas, RS.

das, foram administradas a terneiros nas doses de 1, 2, 4, 6 e 8 g/kg de peso vivo respectivamente, nos meses de setembro e outubro de 1987. No animal que recebeu sementes na dose de 8 g/kg de peso, a mesma foi dividida em duas doses iguais administradas com intervalo de 24 horas; os terneiros restantes receberam as sementes em doses únicas.

Os animais que ingeriram 1, 2, 4 e 8 g/kg de peso eram da raça Holandesa. O bovino que recebeu 6 g/kg de peso era mestiço Hereford.

## RESULTADOS

### Surto espontâneo

A doença ocorreu no município de Bagé, RS, nos meses de dezembro de 1984 e janeiro de 1985, em um grupo de 14 vacas e 14 terneiros da raça Hereford que estavam em uma pastagem de *Lolium multiflorum*, de 8 hectares, severamente invadida por *Ammi majus* (Fig. 1) em estágio de floração e frutificação.

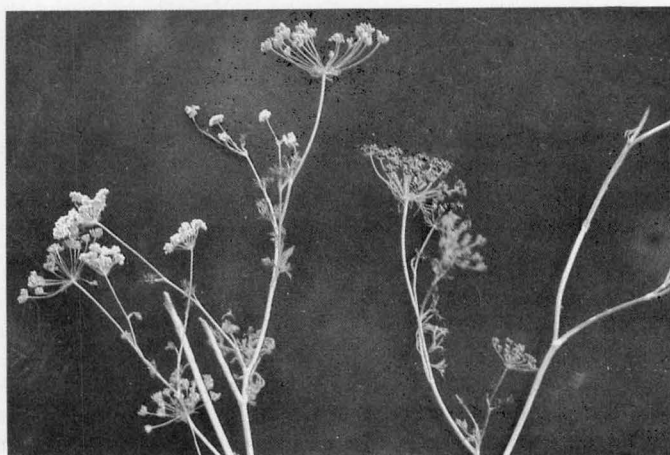


Fig.1. *Ammi majus*, Município de Bagé, Rio Grande do Sul.

Os animais que permaneceram algum tempo na pastagem, apresentaram sinais clínicos de fotossensibilização, caracterizados por dermatite no úbere das vacas e ceratoconjuntivite com corrimento ocular nos terneiros. Essas lesões regrediram rapidamente após terem sido retirados os animais da pastagem.

### Reprodução experimental

No Quadro 1 constam os dados referentes à intoxicação experimental por *Ammi majus* em bovinos.

Nos animais que apresentaram somente corrimento ocular (bovinos nº 3, 5 e 6), este era de aspecto seroso e após 48 horas desaparecia. No bovino nº 2, 48 horas após ter recebido a planta, o corrimento ocular tornou-se purulento, observando-se também edema palpebral no olho direito. Entre 120 e 240 horas após a administração da planta a lesão regrediu.

O terneiro nº 7 apresentou, 24 horas após a administração da planta, corrimento ocular bilateral, congestão do globo ocular e dermatite no focinho. Após 48 horas do

Quadro.1. Intoxicação experimental com *Ammi majus* em bovinos

Bovino nº	Data da colheita (Município)	Quantidade g/kg	Sintomas
1	Jan./85 (Bagé)	9,9 Planta verde	Sem sintomas
2	Jan./86 (Bagé)	1,7 Sementes frescas	Corrimento ocular
3	Jan./87 (Pelotas)	1,0 Sementes refrigeradas	Edema da pálpebra
4	Jan./87 (Pelotas)	2,0 Sementes refrigeradas	Discreto corrimento ocular
5	Jan./87 (Pelotas)	4,0 Sementes refrigeradas	Sem sintomas
6	Jan./87 (Pelotas)	6,0 Sementes refrigeradas	Discreto corrimento ocular
7	Jan./87 (Pelotas)	8,0 Sementes refrigeradas	Discreto corrimento ocular Corrimento ocular, edema das pálpebras, ceratite e dermatite no focinho

início do experimento observaram-se ainda lacrimamento contínuo e edema acentuado das pálpebras; o animal permanecia com os olhos semi-fechados e procurava continuamente a sombra. Nesse dia o animal foi confinado para protegê-lo da luz solar. Dois dias após, além dos sintomas anteriormente mencionados, observou-se ceratite, e nos próximos 5 dias as lesões oculares foram regredindo gradativamente permanecendo apenas uma discreta dermatite no focinho.

## DISCUSSÃO

Os sinais clínicos de fotossensibilização observados nos bovinos que estavam em uma pastagem invadida por *Ammi majus*, no município de Bagé, RS, e a reprodução experimental da doença em terneiros confirmam o diagnóstico de intoxicação por essa planta.

As lesões caracterizadas por dermatite no úbere das vacas e ceratoconjuntivite com corrimento ocular nos terneiros, são similares às mencionadas por Egyed et al. (1974b) e Alvariza et al. (1975). Esses autores observaram, além das lesões descritas neste trabalho, dermatite em outras áreas despigmentadas da pele e no focinho dos animais.

*Ammi majus*, pertencente à família Umbelliferae, contém diversos compostos fotodinâmicos, furocumarínicos, encontrados nas sementes (Fowlks 1959, Abu-Mustafa et al. 1975), os quais com a ação dos raios ultra-violetas através da pele em áreas despigmentadas produzem lesões de fotossensibilização (Egyed et al. 1974a).

Em experimentos realizados em gansos, a administração de talos, flores e sementes de *A. majus* induziu lesões de fotossensibilização (Egyed et al. 1974a) mas, quando foram administradas somente as sementes da planta, as lesões foram mais severas, indicando que a substância capaz de produzir fotossensibilização estaria concentrada nas sementes (Shlosberg et al. 1974). Trabalhos realizados em bovinos e ovinos demonstraram, para essa última espécie, que as sementes têm maior toxicidade que as outras partes da planta (Dollahite et al. 1978, Witzel et al.

1978). Para bovinos, todas as partes das plantas produziram lesões de dermatite no focinho dos animais nas doses de 6,2 a 8,0 g/kg de peso vivo (Dollahite et al. 1978). Neste trabalho, a administração de 9,9 g/kg das diversas partes de *Ammi majus*, a um bovino, não produziu lesões, enquanto as sementes reproduziram lesões de fotossensibilização nas doses de 1,7 a 8 g/kg de peso vivo.

Tem sido mencionado que os compostos fotodinâmicos presentes na planta produziram fotossensibilização pela ingestão ou pelo contato direto (Egyed et al. 1975c, Dollahite et al. 1978). As lesões de dermatite observadas nos animais do município de Bagé, pela sua localização no úbere das vacas e ocular nos terneiros, poderiam ser devidas tanto à ingestão como ao contato direto com a planta. Dermatite de contato também foi observada no homem após exposição a *A. majus* e posterior exposição aos raios solares (Dollahite et al. 1978, Witzel et al. 1978). Em função de sua ação fotodinâmica os compostos isolados das sementes de *A. majus* vêm sendo utilizados terapêuticamente no tratamento do vitiligo e psoríase em seres humanos (Egyed et al. 1976).

Em vista de que *A. majus* é uma invasora frequentemente encontrada em pastagens cultivadas e culturas de inverno em algumas regiões da área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico, pode ser que esta planta possa estar envolvida na etiologia de outros surtos de fotossensibilização primária em bovinos que tem ocorrido nesta região.

#### REFERÊNCIAS

- Alvariza F.R., Corbo M., Meny H., Del Puerto O. & McCosker P. 1975. Fotosensibilización primaria en ganado lechero asociada con *Ammi majus* (Cicuta negra). Terceras Jornadas de Buiatria, Paysandú, Uruguay, com. curta (cc), p. 1-5.
- Abu-Mustafa E.A., El-Bay F.K.A. & Fayed M.B.E. 1975. Ammirin, a new Coumarin constituent from *Ammi majus* L. fruits. *Naturwissenschaften* 62:39-40.
- Dollahite J.W., Younger R.L. & Hoffman G.O. 1978. Photosensitization in cattle and sheep caused by feeding *Ammi majus* (Greater Ammi, Bishop's weed), *Am. J. Vet. Res.* 39(1):193-197.
- Egyed M.N., Malkinson M. & Shlosberg A. 1974a. Observations on the experimental poisoning of young geese with *Ammi majus*. *Avian Pathology* 3(2):79-87.
- Egyed M.N., Shlosberg A., Eilat A., Cohen U. & Beemer A. 1974b. Photosensitization in dairy cattle associated with the ingestion of *Ammi majus*. *Refuah Vet.* 31(3):128-131.
- Egyed M.N., Shlosberg A., Eilat A. & Malkinson M. 1975a. Chronic lesions in geese photosensitized by *Ammi majus*. *Avian Dis.* 19:822-826.
- Egyed M.N., Shlosberg A. & Eilat A. 1975b. The susceptibility of young chickens, ducks, and turkeys to the photosensitizing effect of *Ammi visnaga* seeds. *Avian Dis.* 19:830-833.
- Egyed M.N., Shlosberg A., Eilat A. & Malkinson M. 1975c. Acute and chronic manifestations of *Ammi majus* induced photosensitization in ducks. *Vet. Rec.* 97:198-199.
- Egyed M.N., Shlosberg A., Eilat A., & Malkinson M. 1976. Photosensitization in domestic fowl caused by *Ammi majus*. *Proc. 20th World Vet. Congr., Thessaloniki*, vol. 3, p. 2353-2354.
- Fowlks W.L. 1959. The mechanism of the photodynamic effect. *J. Invest. Derm.* 32:233-247. (Citado por Shlosberg et al. 1974).
- Odriozola E. 1983. Fotosensibilización y queratoconjuntivitis en rumiantes por consumo de semillas de falsa viznaga (*Ammi majus*). *Boln Vet., INTA-Balcarce* n° 30, p. 1-3.
- Shlosberg A., Egyed M.N. & Eilat A. 1974. The comparative photosensitizing properties of *Ammi majus* and *Ammi visnaga* in goslings. *Avian Dis.* 18(4):544-550.
- Shlosberg A. & Egyed M.N. 1978. *Ammi majus* induced photosensitization in chickens and turkey poults. *Refuah Vet.* 35:159-161.
- Trenchi H. 1960. Ingestion of *Ammi visnaga* seeds and photosensitization. The cause of vesicular dermatitis in fowls. *Avian Dis.* 4:275-280.
- Witzel D.A., Dollahite J.W. & Jones L.P. 1978. Photosensitization in sheep fed *Ammi majus* (Bishop's weed) seed. *Am. J. Vet. Res.* 39(2):319-320.

## TRATAMENTO MASSAL DA TUBERCULOSE BOVINA COM ISONIAZIDA<sup>1</sup>

JEROME LANGENEGGER<sup>2</sup>, MARIA IGNÊS CAVALCANTE<sup>3</sup> e ADERSON DANTAS LIRA<sup>4</sup>

**ABSTRACT.** – Langenegger J., Cavalcante M.I. & Lira A.D. 1991. [Massal treatment of bovine tuberculosis with isoniazid.] Tratamento massal da tuberculose bovina com isoniazida. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 11(1/2):21-23. Embrapa-UAPNPSA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851, Brazil.

There were 409 bovines in a Swiss Brown-cattle herd in Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil, reacting positively to the tuberculin test. The tuberculosis was confirmed by necropsy, histopathological and bacteriological procedures. The infected animals were treated with pure crystallised isoniazid, administered orally at a dose of about 25 mg/kg/day, during 60 days consecutively and other 60 doses 3 times a week. The large number of reactors did not allow individual medication. Therefore treatment at a large scale was used in groups of animals varying in weight up to 100 kg. Isoniazid was mixed mechanically, daily, and applied at 12 g per 1 kg of high palatable concentrated ration, furnished in long double troughs. The quantity of feed was calculated based on the media of live weight and the numbers of animals in each group. The clinically affected animals showed recuperation starting with the second month of treatment. Thirty days after the end of the treatment the allergic monitoration began by comparative tuberculinizations at intervals of 2 to 3 months. The cure was evaluated by the gradual tuberculin desensitization. In most animals the tuberculin reactions became negative after 2 to 4 months post-treatment. At the end of this experiment 96.4% of the treated animals were cured. In slaughtered animals no lesions were found.

**INDEX TERMS:** Bovine tuberculosis, massal treatment, isoniazid.

**SINOPSE.** – Num rebanho de bovinos da raça suíça parda, em Mossoró, Rio Grande do Norte, foram encontrados 409 animais reagentes positivos na tuberculinização comparativa com tuberculinas PPDs bovina e aviária. A tuberculose foi confirmada por exames necroscópicos, histopatológicos e bacteriológicos em animais vitimados pela doença. Os bovinos infectados foram submetidos ao tratamento com isoniazida pura, cristalizada, administrada por via oral, na dose de aproximadamente 25 mg/kg pv, durante 60 dias consecutivos e mais 60 doses dadas, em dias alternados, 3 vezes por semana. Face ao grande número, não foi possível medicar cada animal individualmente, optando-se pelo tratamento massal, em lotes de até 80 animais cujo peso variava até 100 kg. A isoniazida era misturada mecanicamente na proporção de 12 g para 1 kg de ração concentrada com alta palatabilidade, fornecida aos animais em cochos coletivos duplos em que cada animal livremente procurava o alimento. A quantidade de ração era calculada a base do peso médio e do número de animais do lote, de modo que cada animal, ao comer o alimento, estava ingerindo sua dose terapêutica de isoniazida. Durante o período da medicação, os animais clinicamente portadores de sintomas de tuberculose, mostravam sua recuperação a partir do segundo mês em diante. Trinta dias após o término da medicação

foi iniciado o monitoramento alérgico pela tuberculinização comparativa com intervalos de 2 a 3 meses. A cura da tuberculose foi avaliada pela gradual dessensibilização à tuberculina. Na maioria dos animais tratados a reação caiu para níveis negativos entre 2 e 4 meses após o término da medicação. No final do trabalho experimental verificou-se que 96,4% dos animais tratados estavam curados. A cura foi confirmada pela inspeção sanitária em animais abatidos em matadouro.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Tuberculose bovina, tratamento massal, isoniazida.

### INTRODUÇÃO

O combate da tuberculose bovina está sendo facilitado, atualmente, pelo tratamento da doença com a hidrazida do ácido isonicotínico (isoniazida) em países que não podem adotar o abate e a indenização dos animais reagentes.

Após os primeiros ensaios sobre o tratamento com a isoniazida por pesquisadores italianos, Kleeberg (1959, 1963, 1966, 1967), Kleeberg & Worthington (1963) e Kleeberg et al. (1966) estabeleceram as bases para a posologia e os critérios para conduzir a eliminação da tuberculose de rebanhos altamente infectados.

Langenegger et al. (1981a) adotaram a metodologia preconizada por Kleeberg e sua equipe e desenvolveram seus trabalhos utilizando doses diárias de 25 mg/kg pv de

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 4 de maio de 1989.

<sup>2</sup> Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal (UAPNPSA), Embrapa, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851.

<sup>3</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPe), Dois Irmãos, Recife, PE 50000.

<sup>4</sup> R. Ernestina Dantas Bezerra 99, Mossoró, RN 59600.

isoniazida cristalizada, aplicada em 60 dias consecutivos e em dias alternados (nas 2<sup>as</sup>, 4<sup>as</sup> e 6<sup>as</sup> feiras) por mais 141 dias, totalizando 120 doses durante 6 meses e 21 dias. Na posologia prevista, o peso de cada animal era determinado em balança ou avaliado por estimativa e para cada 40 kg pv era fornecido 1 g de isoniazida, por via oral, misturada na ração concentrada. Com este esquema de medicação, observados os demais requisitos, foram obtidas curas estéreis em torno de 95% dos bovinos tratados desde 1973.

Em grandes rebanhos com alto índice de bovinos infectados, a medicação individual torna-se muito trabalhosa e o manejo fica difícil se não houver local apropriado e meios de contenção adequada dos animais. Diante desta circunstância foi adotado o "tratamento massal" em comedouros coletivos, cuja metodologia e resultados passam a ser aqui apresentados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Num rebanho de 932 bovinos da raça parda suíça, mantido em semi-confinamento, em Mossoró, Rio Grande do Norte, foram detectados 409 animais reagentes positivos no teste alérgico comparativo, feito com as tuberculinas PPDs bovina e aviária, com 5.000 e 2.500 UI respectivamente. A execução e a interpretação do resultado das reações alérgicas obedeceram às normas oficiais adotadas pelo Ministério da Agricultura (Langenegger et al. 1981b). A tuberculose no rebanho foi confirmada por exames necroscópicos, histopatológicos e bacteriológicos realizados na URPe, Recife, Pernambuco, e na Unidade de Pesquisa em Saúde Animal (UAPNPSA), Embrapa, Rio de Janeiro.

Os bovinos reagentes positivos foram submetidos ao tratamento com isoniazida, sob forma de sal cristalizado, administrado por via oral, na dose de aproximadamente 25 mg/kg pv, durante 60 dias consecutivos e mais 60 vezes, em dias alternados, mais precisamente, nas 2<sup>as</sup>, 4<sup>as</sup> e 6<sup>as</sup> feiras, perfazendo um total de 120 doses em um período de 6 meses e 21 dias (Langenegger et al. 1981a).

O "tratamento massal" foi feito em cochos coletivos de 32 metros de comprimento, com divisória ao meio no sentido longitudinal, permitindo assim que lotes de até 80 bovinos pudessem ser arraçoados simultaneamente. A isoniazida foi adicionada à ração concentrada de alta palatabilidade, na proporção de 12 g para 1 kg de ração e misturada sempre na hora, em misturador mecânico de 500 kg. Os animais foram divididos em lotes com pesos variando de até 100 kg de diferença. O peso médio do lote era utilizado como referência para o cálculo da dose de isoniazida. Assim para as vacas com peso médio em torno de 480 kg de peso vivo foi fornecido 1 kg da mistura da ração concentrada contendo 12 g de isoniazida. Aos lotes das vacas mais leves, das novilhas, dos garrotes e dos bezerros, a quantidade de ração era reduzida de tal forma que cada animal, ao comer esta quantidade de ração, estava ingerindo o equivalente a 25 mg/kg pv de isoniazida. Foi controlado se houve recusa do alimento com a isoniazida pelos animais durante a 1<sup>a</sup> semana.

Após o término da medicação, passados pelo menos 30 dias, a cura da tuberculose foi avaliada pela gradual dessensibilização alérgica, aferida por até 5 tuberculinizações com intervalos de 2 a 3 meses, por períodos de até 18 meses.

## RESULTADOS

O efeito do tratamento com isoniazida, feita nesta forma massal de administrar, tornou-se evidente já precocemente em animais clinicamente doentes que melhoraram o estado de nutrição. O pelo se tornou liso e brilhante, parou a tosse e linfonodos aumentados começaram a regressar a partir dos 60 dias de medicação.

As tuberculinizações pós-tratamento, feitas com intervalos de 2 a 3 meses, revelaram progressiva redução da reação alérgica até o seu desaparecimento. Este monitoramento alérgico mostrou que a maioria dos animais passou a reagir negativamente entre o 2<sup>o</sup> e o 4<sup>o</sup> mês após o término da medicação. Em alguns animais porém, a dessensibilização se estendeu até o 12<sup>o</sup> mes. O monitoramento alérgico pós-tratamento constou de até 5 tuberculinizações, nos primeiros grupos tratados, num período de 18 meses. Na última tuberculinização de todos os animais tratados comprovou-se que 96,4% não eram mais reagentes. A cura da tuberculose foi confirmada na inspeção sanitária de vários animais de descarte, abatidos em matadouro oficial.

## DISCUSSÃO

Na presente pesquisa foi utilizada a posologia preconizada por Langenegger et al. (1986a), mas ao invés de cada bovino ser contido e tratado individualmente, foi optado pela "medicação massal", sem a contenção dos animais que, em torno de cochos coletivos, disputaram a ração concentrada com a isoniazida. Kleeberg & Weyland (1961) fizeram restrições ao fornecimento da mistura da isoniazida na alimentação ou na água de beber em cochos coletivos, pois observaram grande variação individual do nível da isoniazida no sangue dos animais assim medicados. Na implantação do experimento, além desta objeção, ainda forma levantadas dúvidas que dificilmente poderiam ser esclarecidas caso o resultado não fosse bom, tais como:

a) Cada bovino vai ingerir a dose terapêutica nesta livre competição do alimento no cocho coletivo. Como controlar?

b) A diferença de até 100 kg pv dos bovinos no mesmo grupo corresponderia a 1,25 g de isoniazida a mais do que a dose prevista para os animais mais leves e 1,25 a menos para os mais pesados. Qual seria a consequência?

c) O misturador mecânico da ração estaria distribuindo homogeneamente as 12 g de isoniazida em 1 kg da ração concentrada. Como avaliar isto?

d) Se o índice de cura ficasse aquém dos 95% esperados, qual seria o custo/benefício, comparado com a medicação individual?

O sucesso do tratamento massal da tuberculose, com a cura de 96,4% dos animais, atribuiu-se também a um conjunto de fatores circunstanciais que certamente atenuaram tanto a restrição feita por Kleeberg (1967) como as demais dúvidas. Dentre os aspectos favoráveis cumpre assinalar de que o gado da raça suíça é naturalmente dócil, que todos os animais eram descornados (mochos) e já tinham o hábito de, livremente, comerem juntos em co-

chos coletivos. Assim, durante o arraçoamento com a mistura concentrado-isoniazida, os animais não se afastavam do cocho enquanto havia presença do alimento. Outro fator importante foi a palatabilidade da ração que os animais procuravam avidamente não se importando com a presença da isoniazida. Animais das raças zebuínas, às vezes, rejeitam a ração quando misturada com o medicamento na proporção de 12 g para 1 kg de ração.

A diferença de peso de até 100 kg pv de animais do mesmo lote não deve ter influenciado a eficácia do tratamento, provavelmente, porque os animais mais fortes (maiores) são também os mais avarentos e, entre os bezerros, garrotes e novilhas, é notório que a quantidade de alimento apreendida pelos animais mais desenvolvidos é maior num mesmo espaço de tempo, e assim, julga-se ter havido a auto-regulação da dose do medicamento para cada animal.

O resultado do experimento, por si só, revelou que o misturador mecânico distribuiu satisfatoriamente a isoniazida no concentrado. Não seria aconselhável fazer esta mistura manualmente, pois certamente a variação da presença do medicamento seria grande. Muito importante é fazer-se esta mistura sempre no dia e horas antes de ser fornecida aos animais, pois a isoniazida é higroscópica e uma vez dissolvida, perde em pouco tempo a ação terapêutica. Se tivesse havido um menor índice de cura do que o esperado, não seria possível, na ocasião, dispor de análises laboratoriais que comprovassem a falta de homogeneidade da mistura.

O questionamento sobre o custo-benefício também ficou sem efeito, na forma apresentada face ao bom resultado alcançado. Por estimativa, o tratamento massal necessitou de apenas da metade da mão-de-obra do que o tratamento individual exigiria nas condições locais do experimento em causa.

Por outro lado, os bons resultados preliminares com tratamento intermitente da isoniazida em bovinos (Langenegger et al. 1989) podem também justificar o bom desempenho do tratamento massal em que a ação de doses maiores e menores em períodos alternados, possam ter

exercido um efeito exaustivo para *Mycobacterium bovis*, mais acentuado do que a ação contínua do quimioterápico.

O resultado do presente trabalho abre a possibilidade do tratamento da tuberculose de bovinos criados extensivamente. Embora seja bastante rara a ocorrência da tuberculose em gado de corte, há no Brasil vários registros. Nesta situação está a espera de solução o controle da tuberculose bovina e bubalina na Ilha de Marajó, Pará. A doença está sendo diagnosticada há vários anos pela Inspeção Federal no Matadouro de Tapanã, em Belém, e por tuberculinizações em ambas as espécies criadas extensivamente (Alfinito et al. 1986). O tratamento massal da tuberculose com isoniazida de animais de alto valor zootécnico poderá ser uma alternativa.

#### REFERÊNCIAS

- Alfinito J., William J. & Oliveira F.B. 1986. Estudo epidemiológico da tuberculose na Ilha de Marajó. Anais XX Congr. Bras. Med. Vet., Cuiabá, p. 216. (Resumo)
- Kleeberg H.H. 1959. The treatment of tuberculosis in man and animals with isoniazid. Preliminary report. J.S. Afr. Vet. Med. Ass. 30:69-73.
- Kleeberg H.H. 1963. Eradication of bovine tuberculosis. J.S. Afr. Vet. Med. Ass. 34:393-398.
- Kleeberg H.H. 1966. Chemotherapy and chemoprophylaxis of tuberculosis in cattle. Adv. Tuberc. Res. 15:189-196.
- Kleeberg H.H. 1967. The use of chemotherapeutic agents in animal tuberculosis. Veterinarian, Oxford, 4:197-211.
- Kleeberg H.H. & Weyland H. 1961. Isoniazid administration and blood level in cattle. J.S. Afr. Vet. Med. Ass. 32:349-358.
- Kleeberg H.H. & Worthington R.W. 1963. A modern approach to the control of bovine tuberculosis. J.S. Afr. Vet. Med. Ass. 34:383-391.
- Kleeberg H.H., Nixon R.C. & Worthington R.W. 1966. Evaluation of isoniazid in the field control of bovine tuberculosis. J.S. Afr. Vet. Med. Ass. 37:219-228.
- Langenegger J., Langenegger C.H. & Oliveira J. 1981a. Tratamento da tuberculose bovina com isoniazida. Pesq. Vet. Bras. 1:1-6.
- Langenegger J., Langenegger C.H., Mota P.M.P.C. & Leite R.C. 1981b. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. Pesq. Vet. Bras. 1:145-150.
- Langenegger J., Leite G.O. & Oliveira Jr. J., 1991. Tratamento intermitente da tuberculose bovina com isoniazida. Pesq. Vet. Bras. 11(3/4). (No prelo)

## INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Stryphnodendron coriaceum* (Leg. Mimosoideae) EM BOVINOS<sup>1</sup>

CARLOS HUBINGER TOKARNIA<sup>2</sup>, PAULO VARGAS PEIXOTO<sup>3</sup>, ALDO GAVA<sup>4</sup> e JÜRGEN DÖBEREINER<sup>5</sup>

**ABSTRACT.**- Tokarnia C.H., Peixoto P.V., Gava A. & Döbereiner J. 1991. [Experimental poisoning of cattle by *Stryphnodendron coriaceum* (Leg. Mimosoideae) pods.] Intoxicação experimental por *Stryphnodendron coriaceum* (Leg. Mimosoideae) em bovinos. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 11(1/2):25-29. Depto Nutrição Animal, Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro and Embrapa-NPSA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851, Brazil.

Clinical and pathological data are presented on the experimental poisoning of cattle by *Stryphnodendron coriaceum* Benth. (Leg. Mimosoideae), an important toxic plant in the State of Piauí, northeastern Brazil. The whole pods of this tree were administered orally, in single or split doses, to 15 young bovines. A single dose of 10 g/kg caused death of all animals. The same dose split in 2 or 4 daily administrations (5 g/kg for 2 or 2.5 g/kg for 4 days) caused death of one third and symptoms of variable intensity in the rest of the animals; 1.25 g/kg/day given for 8 days, did not cause any poisoning symptoms. First symptoms in the animals which suffered severe poisoning (12 animals) were observed 24 to 72 hours after feeding pods. The course of the poisoning in the animals that died varied from 3 to 23 days. Digestive disturbances were the most obvious clinical symptoms; the most important of these were congestion of the mucosa of the oral cavity and salivation. Vomiting of ruminal contents, with consequent aspiration pneumonia was seen in some animals. There were some cases of diarrhea. Slight photosensitization of short duration occurred initially; in one animal the skin lesions were severe enough as to evolve from the congestive phase to exudation and necrosis of the superficial parts of the skin. There were some cases of slight icterus. The most important post-mortem finding was edema of the mucosa of the abomasum. Histopathological examinations showed degenerative changes in liver and kidney and sometimes bile pigment in the liver.

**INDEX TERMS:** Poisonous plants, *Stryphnodendron coriaceum*, Leguminosae Mimosoideae, bovines, pathology.

**SINOPSE.**- São fornecidos os dados clínico-patológicos da intoxicação experimental em bovinos por *Stryphnodendron coriaceum* (Leg. Mimosoideae), importante planta tóxica de interesse pecuário do Piauí. As favas desta árvore foram administradas por via oral, inteiras, em doses únicas ou repetidas, a 15 bovinos jovens. A dose de 10 g/kg administrada de uma só vez, causou a morte de todos os bovinos. Esta mesma dose quando subdividida em 2 ou 4 administrações diárias (5 g/kg em 2 ou 2,5 g/kg em 4 dias seguidos), causou a morte de um terço e sintomas de intensidade variável no restante dos animais; 1,25 g/kg/dia administrados durante 8 dias seguidos, não causaram sintomas de intoxicação. Os primeiros sintomas nos animais que sofreram intoxicação mais grave (12 bovinos) foram observados 24 a 72 horas após a 1ª administração da fava. A evolução da intoxicação nos animais que morreram foi de 3 a 23 dias. No quadro clínico predominaram perturbações digestivas; as mais importantes foram conges-

tão da mucosa bucal e sialorréia, em alguns havendo regurgitamento de conteúdo ruminal, com conseqüente bronco-pneumonia por aspiração. Em alguns casos houve diarreia. Havia leve fotossensibilização passageira logo no início da intoxicação; só em um animal esta foi tão forte que evoluiu da fase congestiva passando pela fase exudativa até a necrose da pele. Às vezes havia leve icterícia. À necropsia havia edema da mucosa do abomaso e histologicamente observaram-se lesões degenerativas no fígado e rim, às vezes com presença de pigmento biliar no primeiro.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Plantas tóxicas, *Stryphnodendron coriaceum*, Leguminosae Mimosoideae, bovinos, patologia.

### INTRODUÇÃO

Uma das plantas tóxicas de interesse pecuário mais importantes do Piauí é *Stryphnodendron coriaceum* Benth. (Leg. Mimosoideae), conhecida popularmente como "barbatimão". As favas desta árvore amadurecem na época de seca quando caem ao chão e são ingeridas pelos bovinos. (Figs. 1 e 2) Grandes mortandades ocorrem em anos em que a produção de favas de *S. coriaceum* é mais elevada e em que suas favas caem antes das da "faveira" *Parkia platycephala* (fam. Leg. Mimosoideae), que nesta

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 29 de maio de 1989.

<sup>2</sup> Departamento de Nutrição Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ 23851; bolsista do CNPq (305010-76/VT).

<sup>3</sup> Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário - Camobi, Santa Maria, RS 97119.

<sup>4</sup> Universidade para o Desenvolvimento de Santa Catarina, Centro Agroveterinário, Av. Luiz de Camões 2090, Lages, SC 88500.

<sup>5</sup> Embrapa-NPSA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851; bolsista do CNPq (305294/88-1/VT).

época constitui uma ótima forragem para o gado na “zona do agreste”. (Döbereiner & Canella 1956)

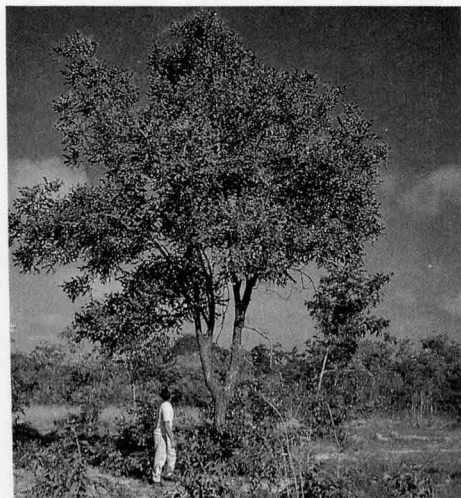


Fig. 1. *Stryphnodendron coriaceum* Benth. (fam. Leg. Mim.) no município de Teresina, Piauí. A casca áspera do tronco é um aspecto característico dessa árvore.

Achamos oportuno alertar, que o termo barbatimão é usado também para todas as outras espécies e taxa de *Stryphnodendron* existentes no Brasil (28 ao todo).

Döbereiner & Canella (1956) descreveram o quadro clínico da intoxicação espontânea por *S. coriaceum* e realizaram necropsias e exames histopatológicos em 3 bovinos (um deles morto naturalmente pela intoxicação e 2 sacrificados). Esses autores também administraram a fava de *S. coriaceum* a 2 bovinos, que adoeceram e foram sacrificados no 6º e 8º dias do experimento e descreveram o quadro clínico-patológico neles observado. Concluem que o quadro anatomo-clínico observado nos bovinos experimentais foi praticamente idêntico àquele observado durante o surto de intoxicação observado no Piauí.

Como o número de experimentos feitos com as favas de *S. coriaceum* foi pequeno, no presente estudo foram realizados mais experimentos com o fim de se obter dados adicionais sobre o quadro clínico-patológico e a evolução da intoxicação por *S. coriaceum* em bovinos, bem como sobre a sua toxicidade.

MATERIAL E MÉTODOS

As favas de *S. coriaceum* guardadas à temperatura ambiente, foram administradas, sempre nos meses seguintes à colheita, inteiras, por via oral, em doses únicas ou repetidas, a bovinos jovens desmamados, na maioria mestiços da raça holandesa preta/branca e com 1 a 2 anos de idade. As favas administradas eram procedentes do município de Teresina, Piauí, com exceção das usadas nos experimentos com os Bovinos 831, 832 e 833, que procederam do município de Fortaleza, Ceará.

Os animais de experimentação eram mantidos em baias individuais, com água à vontade, sendo o consumo de ração e forragem controlado. Durante a maior parte do dia eram deixados ao ar livre, no sol (aproximadamente das 8 às 11 e das 13 às 17 horas).

Os bovinos eram examinados diariamente antes e durante o

Quadro 1. Experimentos realizados em bovinos com as favas de *Stryphnodendron coriaceum*, doses únicas

Bovino Nº (mat. reg. S.M.P.)	Peso kg	Administração		Desfecho	Tempo entre início da adm. da planta e início dos sintomas	Sintomas					Achados de necropsia					
		Data	Quantidade g			Anorexia	Constipação mucosa bucal	Sialorréia	Regurgitamento	Bronco pneumonia	Diarréia líquida	Andar cambaleante	Fotosensibilização	Icterícia	Queda dos pelos da ponta da cauda	
831 (13823-13824)	90	6.1.61	2000	22,2	Morreu	aprox. 48 h	13 dias	+++	-	++	-	-	-	-	-	Abomaso com congestão +
832 (13812)	70	6.1.61	1500	22,4	Morreu	aprox. 24 h	5 dias	++	-	++	-	-	-	-	-	Icterícia generalizada +
833 (13831-13832)	70	15.1.61	2500	35,7	Morreu	aprox. 24 h	11 dias	++	-	+	-	-	-	-	-	Icterícia generalizada +. Fígado mais claro. Abomaso com edema das dobras +
4488 (23393-23395) 4499	123	4.10.84	1230	10	Morreu	aprox. 72 h	23 dias	++	++	+++	-	-	-	-	-	Abomaso com edema das dobras +. Ceco e intestino grosso com conteúdo líquido
4716	100	17.11.84	250	2,5	Sem sintomas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4722	198	2.11.84	990	5	Leves sintomas	aprox. 48 h	3 dias	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4868 (24772)	153	5.11.84	765	5	Discretos sintomas	aprox. 48 h	1 dia	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
4874 (25006)	186	4.12.89	1860	10	Morreu	aprox. 72 h	7 1/2 dias	+++	++	-	-	-	-	-	-	Icterícia generalizada (+). Fígado mais claro. Abomaso com úlceras ++. Intestino delgado com áreas de congestão
4877	138	3.10.90	1380	10	Morreu	aprox. 48 h	6 dias	+++	+++	-	-	-	-	-	-	Fígado mais claro. Rúmen e retículo com congestão difusa +. Abomaso com congestão difusa ++ e edema das dobras ++.
4881	142	20.9.90	355	2,5	Sem sintomas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4881	106	20.9.90	265	2,5	Sem sintomas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ Manifestações ou lesões acentuadas, ++ moderadas, + leves, (+) discretas.

experimente, e, dependendo da evolução do quadro clínico, mais frequentemente, com tomada de temperatura, auscultação do coração, pulmão e rúmen, verificando-se com cuidado especial o aparecimento de icterícia, de lesões da pele e de alterações na mucosa bucal.

Em casos de morte, fazia-se imediatamente a necropsia, complementada por coleta de material para exames histopatológicos, constituído de fragmentos de órgãos das cavidades torácica e abdominal, bem como do sistema nervoso central. Esses fragmentos eram fixados em formol a 10%, processados rotineiramente e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

RESULTADOS

Os principais dados dos experimentos de administrações únicas de favas de *Stryphnodendron coriaceum* constam do Quadro 1, os de administrações repetidas do Quadro 2 e os achados histopatológicos de ambos do Quadro 3.

Pela leitura desses Quadros observa-se que não houve muitas diferenças entre os resultados dos experimentos de administrações únicas e repetidas das favas de *S. coriaceum* em relação ao período decorrente entre a 1ª administração e o aparecimento dos primeiros sintomas; a evolução e o quadro clínico-patológico da intoxicação experimental também foram muito semelhantes.

Nos experimentos de administrações de doses únicas verificou-se que doses a partir de 10 g/kg causaram intoxicação grave em todos os 6 animais, finalizando com a morte de todos eles. Doses únicas de 5 g/kg causaram leves ou discretos sintomas de intoxicação e de 2,5 g/kg não causaram o aparecimento de sintomas.

Nos 6 casos de intoxicação com êxito letal, nos experimentos de administrações únicas, os primeiros sintomas foram observados 24 a 72 horas após a administração da fava. A evolução da intoxicação nesses casos variou de 5 a 23 dias.

Nos experimentos de administrações repetidas, doses de 2,5 e 5 g/kg administradas em 4 e 2 dias seguidos respectivamente, isto é, até completar 10 g/kg, causaram sintomas graves de intoxicação em 4 animais, com morte de 2 deles. Dois outros mostraram apenas sintomas leves ou moderados. Dos 2 animais que adoeceram gravemente, um somente não morreu (Bov. 4873 que recebeu 2,5 g/kg x 4) por ter recebido cuidados especiais (administração de antibióticos em função da broncopneumonia). Administração de 5 g/kg em 4 dias seguidos, também causou a morte do animal (Bov. 4447). Doses de 1,25 g/kg/dia administradas durante 8 dias seguidos, também até completar 10 g/kg, não causaram sintomas de intoxicação.

Os primeiros sintomas, nos animais que receberam doses repetidas, e que adoeceram moderada (1 bovino) ou gravemente (5 bovinos), com ou sem êxito letal, foram observados 48 a 72 horas após a primeira administração.

A evolução da intoxicação nos animais que morreram foi de 3 a 12 dias. Tomando-se como base os animais que sofreram intoxicação mais grave (com sintomas moderados ou acentuados e que morreram), tanto nos experimentos de administrações únicas como repetidas, verifica-se que os principais aspectos do quadro clínico-pato-

Quadro 2 - Experimentos realizados em bovinos com as favas de *Stryphnodendron coriaceum*, doses repetidas

Bovino Nº (mat. reg. SAP)	Peso kg	Administração		Desfecho	Tempo entre início da adm. da planta e início dos sintomas	Evolução	Sintomas					Achados de necropsia					
		Data	Quant. g				Dose g/kg	Anorexia	Congestão mucosa bucal	Sialorréia	Regurgi- tamento (Fig.5)		Bronco- pneu- monia	Diarréia líquida	Andar camba- leante	Fotos- sens- ibili- zação	Icterícia
4447 (23382)	160	4.10-7.10.84	810x4	5x4	Morreu (bronco- pneu- monia)	aprox. 72h	3 dias	++++	-	++	+++ (Fig.5)	+++	-	++	-	-	Broncopneumonia. No rúmen e abomaso presença de algumas sementes de <i>S. coriaceum</i> . Abomaso com congestão ++ e edema das dobras ++. Intestino delgado com áreas de congestão
4451	157,5	8.11-15.11.84	196,8x8	1,25x8	Sem sintomas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4487 (23384)	128	5.10-8.10.84	320x4	2,5x4	Morreu	aprox. 72h	12 dias	+++	+	-	-	-	+++	-	-	-	Icterícia generalizada ++ (+). Fígado, ao corte, mais claro. Rúmen com presença de algumas cascas de sementes de <i>S. coriaceum</i> . Abomaso com suftuões e acentuado edema das dobras. Intestino delgado com áreas extensas de necrose difterídica
4869	142	4.12-5.12.89	710x2	5x2	Leves sintomas	aprox. 120h	3 dias	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4870 (24785)	176	13.2.-14.2.90	880x2	5x2	Morreu (bronco- pneu- monia)	aprox. 48h	5 dias	+++	-	-	+++	-	-	++	+	+	Broncopneumonia. Fígado, ao corte, mais claro. Rúmen com poucas e abomaso com muitas sementes de <i>S. coriaceum</i> . Abomaso com congestão ++. Intestino delgado com edema da parede. Ceco com conteúdo líquido. Reto com pelúculas na mucosa
4872	126	4.12.-7.12.89	320x4	2,5x4	Sintomas moderados	aprox. 72h	5 dias (fase aguda)	++	-	-	-	-	-	+	++	(+)	-
4873	137	6.3-9.3.90	350x4	2,5x4	Sintomas acentuados (bronco- pneumonia, recebeu antibiótico)	aprox. 72h	34 dias	++	+++	+++	+	+++	+++	+	+	-	+++
4878	132	27.9-28.9.90	660x2	5x2	Sintomas acentuados	aprox. 48h	15 dias	++(+)	+	-	-	-	-	+	-	-	-
4879	150	20.9-27.9.90	187,5x8	1,25x8	Sem sintomas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4880	139	20.9-27.9.90	174x8	1,25x8	Sem sintomas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a + + + Manifestações ou lesões acentuadas, + + moderadas, + leves, (+) discretas.

Quadro 3. Alterações histológicas nos bovinos que morreram pela intoxicação experimental pelas favas de *Styryphnodendron coriaceum*

Bovino	Fígado										Rim		Outros órgãos		
	Tumefação de hepatócitos	Vacuolização de hepatócitos	Necrose de hepatócitos	Edema do espaço de Disse	Dilatação dos túbulos uriníferos e espaços de Bowman	Necrose celular e neutrofilos em túbulos uriníferos	Filtrado protéico nos espaços de Bowman e túbulos uriníferos	"Degeneração em gotas hialinas"	Cilindros hialinos e granulares nos túbulos	Tumefação e vacuolização de células epiteliais tubulares	Lise de células epiteliais tubulares				
Experimentos de administrações únicas															
831 (13823-24)	+	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)	-	+	+	-	-	-	-	Intestino delgado com congestão da mucosa ++
832 (13812)	+	-	-	(+)	+(+)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
833 (13831-32)	+	-	-	-	++	-	-	+(+)	+	+	+	+++	++	-	-
4488 (23393-95)	-	-	+	+	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Abomaso com edema da submucosa +
4868 (24772)	+(+)	+(+)	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Abomaso com presença de fibras na mucosa ++ Intestino delgado com congestão + e áreas focais de necrose na mucosa +(+) Rúmen, retículo e omaso com edema no limiar do epitélio com a própria + e áreas de congestão na própria ++
4874 (25006)	-	++	-	++	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Abomaso com congestão da própria +(+) Intestino delgado e ceco com áreas de congestão na mucosa ++
Experimentos de administrações repetidas															
4447 (23382)	+	(+)	+(+)	+	+	+	+	+	+	++	+	++	++	+	Abomaso com edema na submucosa ++ Pulmão com broncopneumonia de aspiração
4487 (23384)	+	+	+(+)	+	+(+)	+	+	+	+	++ (Fig. 5)	+	+++ (Fig. 5)	+++ (Fig. 5)	++	Traço de bile sob forma de cristais em vasos túbulos uriníferos. Abomaso na submucosa com edema ++, na mucosa com áreas de necrose +(+) e hemorragias ++. Intestino delgado com enterite pseudomembranosa-difteróide ++(4)
4870 (24795)	+	(+)	+(+)	-	+(+)	+	+	+	+	++ (Fig. 5)	+	++	++	+	Intestino delgado com edema na submucosa +. Rins com infartos. Pulmão com broncopneumonia de aspiração. Fígado com esteras eosinofílicas no citoplasma de hepatócitos

a Lesões leves, ++ moderadas, +++ acentuadas, (+) discretas.

lógico da intoxicação pelas favas de *S. coriaceum* em bovinos foram os seguintes:

Os sintomas observados (12 bovinos) foram: anorexia (12), congestão da mucosa bucal (6), sialorréia (6), regurgitamento de conteúdo ruminal (4), com consequente aspiração de alimentos e broncopneumonia (3), diarreia forte (4), andar cambaleante (10), manifestações e lesões cutâneas de fotossensibilização leves e passageiras (5), ou moderadas (1), esclera e mucosas discreta (1) ou levemente (2) ictéricas, queda dos pelos da ponta da cauda (2).

Os achados de necropsia (8 bovinos) foram broncopneumonia por aspiração (2), icterícia geral discreta (1) ou leve (3) e fígado ao corte difusamente mais claro (5). Em relação ao aparelho digestivo, presença, nos pro-ventrículos, de algumas sementes ou cascas de *S. coriaceum* (4), no abomaso, presença de algumas (1) ou muitas (1) sementes de *S. coriaceum*, edema de suas dobras (5), presença de úlceras (1), congestão (4) e sufusões (1); no intestino delgado, áreas de congestão (3), necrose difteróide (1), edema da parede (1); no ceco, conteúdo líquido (2); no cólon, conteúdo líquido (1); no reto, presença de petéquias na mucosa (1).

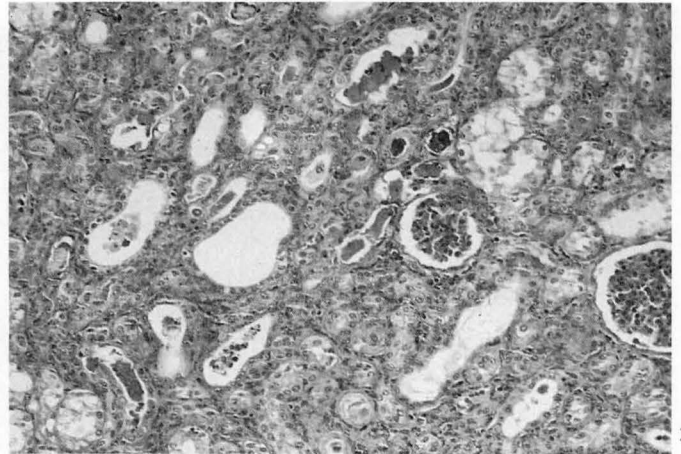
Os exames histopatológicos (8 bovinos) revelaram no fígado tumefação difusa de hepatócitos (8), que mostravam núcleos vesiculosos, cromatina marginada e nucléolos mais evidentes, vacuolização de hepatócitos (6), presença de células isoladas com citoplasma eosinófilo e núcleo variavelmente contraído (necrose incipiente) (7), edema do espaço de Disse (7), dilatação de sinusóides (4), presença de pigmento biliar (3) e presença de hepatócitos e neutrófilos em sinusóides e veias (4). No rim observaram-se dilatação de túbulos uriníferos e do espaço de Bowman (8) (Fig. 3), presença de células epiteliais com núcleo em picnose e às vezes citoplasma eosinófilo de túbulos uriníferos (necrose) (6), massas de detritos celulares na luz dos túbulos (8), filtrado protéico sob forma de glóbulos nos túbulos e nos espaços de Bowman (7), "degeneração em gotas hialinas" (4), presença de cilindros hialinos e granulares (5) e tumefação e vacuolização de células epiteliais dos túbulos uriníferos (4) com evolução para lise (4) (Fig. 4). No rúmen, retículo e folhoso havia leve edema no limiar do epitélio com a própria (1) e áreas de congestão na própria (1). No abomaso verificaram-se congestão (1) e hemorragias (1) na mucosa, e edema de sua submucosa (3) (Fig. 5), úlceras (1) e áreas de necrose na superfície da mucosa (1). No intestino delgado observaram-se congestão da mucosa (3), enterite pseudomembranosa/difteróide (1), áreas focais de necrose na mucosa (1) e edema da submucosa (1). No pulmão havia broncopneumonia de aspiração (2).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

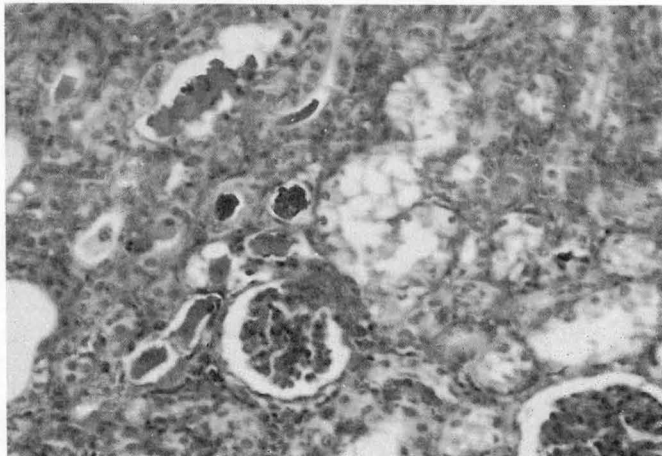
O quadro clínico-patológico observado nos experimentos realizados durante o presente estudo com as favas de *S. coriaceum* é bastante concordante com o da intoxicação espontânea descrita por Döbereiner & Canella (1956).



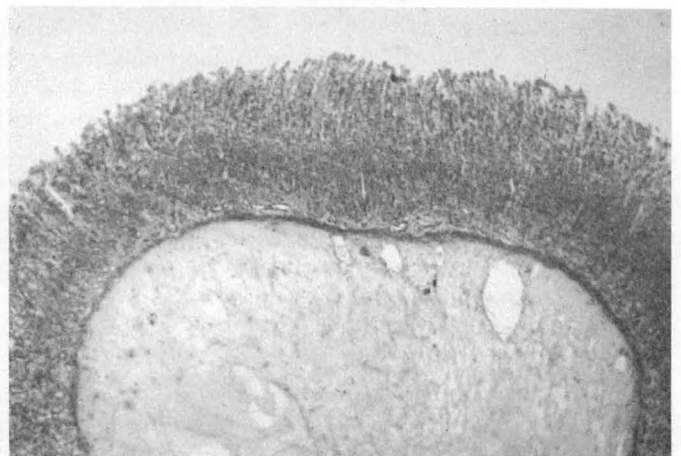
2



3



4



5

Fig. 2. Os frutos (favas) maduros de *S. coriaceum*.

Fig. 4. Grupos de túbulos uriníferos em que as células epiteliais estão com tumefação e vacuolização evoluindo para lise; vê-se ainda detritos celulares e poucos cilindros hialinos em outros túbulos. Intoxicação experimental por *S. coriaceum*. (Bov. 4487, SAP 23384). HE, obj. 25.

Fig. 3. Dilatação de túbulos uriníferos e dos espaços de Bowman, na intoxicação experimental por *S. coriaceum*. (Bov. 4487, SAP 23384). HE, obj. 16.

Fig. 5. Edema acentuado da submucosa da parede do abomaso, na intoxicação experimental por *S. coriaceum*. (Bov. 4487, SAP 23384). HE, obj. 4.

Esses autores somente não descreveram a congestão da mucosa bucal, o regurgitamento de conteúdo ruminal e consequente broncopneumonia, o andar cambaleante e a queda dos pelos da ponta da cauda, observados durante o presente estudo experimental.

Os experimentos realizados com *S. coriaceum* em bovinos, mostram, que no quadro clínico predominam perturbações digestivas; os sintomas mais importantes são congestão da mucosa bucal e sialorréia, em alguns casos havendo regurgitamento de conteúdo ruminal. No caso de haver regurgitamento, este pode acarretar broncopneumonia por aspiração. Em alguns casos houve diarreia.

Há fotossensibilização leve e passageira logo no início da intoxicação; só em um animal essa alteração foi tão intensa que evoluiu da fase congestiva passando pela fase exudativa até a necrose da pele (gangrena seca). Às vezes há icterícia leve.

No quadro patológico o mais importante são edema da mucosa do abomaso e lesões degenerativas no fígado e rim, às vezes com presença de pigmento biliar no fígado.

Através dos presentes experimentos, verifica-se que a dose letal de *S. coriaceum* para bovinos é de 10 g/kg, quando administrada de uma só vez. Esta mesma dose quando subdividida em 2 ou 4 administrações diárias (5 g/kg em 2 ou 2,5 g/kg em 4 dias seguidos) causou a morte de um terço e sintomas de intensidade variável no restante dos animais; 1,25 g/kg/dia administrados durante 8 dias seguidos, não causaram sintomas de intoxicação.

Pode-se concluir que a intoxicação pela fava de *S. coriaceum* tem ação irritante ou caustica sobre o trato digestivo, e acarreta, adicionalmente, lesões hepáticas e renais. As manifestações de fotossensibilização são, provavelmente, de origem hepatógena.

*Agradecimentos.*- Agradecemos ao colega veterinário Darcio de Almeida Passos, Professor da Universidade Federal do Piauí, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Teresina, Piauí, pela colheita e remessa das favas de *S. coriaceum*.

## REFERÊNCIAS

- Döbereiner J. & Canella C.F.C. 1956. Intoxicação de bovinos pela fava do "barbatimão" (*Stryphnodendron coriaceum* Bth.). Bolm Soc. Bras. Med. Vet. 24:49-68.

## PREVALÊNCIA E DIAGNÓSTICO COMPARATIVO DA LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO<sup>1</sup>

CHARLOTTE HUBINGER LANGENEGGER<sup>2</sup>, JEROME LANGENEGGER<sup>2</sup> e PAULO OLDEMAR SCHERER<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Langenegger C.H., Langenegger J. & Scherer, P.O. 1991. [Prevalence and comparative diagnosis of caseous lymphadenitis in goats from Rio de Janeiro State.] Prevalência e diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos do Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 11(1/2):31-34. Proj. Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851, Brazil.

The prevalence of caseous lymphadenitis in 13 goat herds with 760 adult animals (58.4 herd/media) in the State of Rio de Janeiro was evaluated by clinical, serological and allergical diagnostic procedures. Three herds (23.0%) were free and 10 (77.0%) were infected by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the infection rate varied from 3.6% to 100% in these herds. From the 760 goats, 171 (22.5%) showed lesions and/or serological and/or allergical immune response. Separately, the clinical examination based on inspection and palpation revealed 93 (12.2%) cases of lymphnode abscedation and/or scars of prior ruptured lesions. The serological test made by the synergistic hemolysis inhibitor test showed antibodies in 146 (19.2%) goats with titers varying from 1:20 to 1:1256, and the allergical sensitization measured by the lymphadenization test presented positive reaction up to 1.5 mm increase in the thickness of skin-folds in 168 (22.1%) animals. The allergy test was the most sensitive and specific diagnostic procedure and proved to be a practical method to detect pré-clinical infections in the field.

**INDEX TERMS:** Caseous lymphadenitis, prevalence, diagnostic procedures.

**SINOPSE.-** Foram examinados 13 rebanhos de caprinos leiteiros no Estado do Rio de Janeiro, constituídos por 760 (média 58,4/rebanho) animais de raças puras e mestiças. Utilizou-se o exame clínico para localizar lesões suspeitas através de inspeção e palpação dos linfonodos superficiais; o exame sorológico para evidenciar antitoxinas pela técnica da inibição da hemólise sinérgica e o teste alérgico da linfadenização para avaliar a imunidade mediada por células. A pesquisa revelou que três (23,0%) rebanhos estavam indenes e 10 (77,0%) infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, variando a incidência de 3,6% a 100% de infecções nos rebanhos. Dos 760 caprinos, 171 (22,5%) apresentaram lesões e/ou reações positivas nos testes utilizados. Individualmente, o exame clínico revelou em 93 (12,2%) dos caprinos a presença de linfonodos abscedados e/ou cicatrizes na pele de ulcerações anteriores. O exame sorológico acusou a presença de antitoxinas com título igual ou superior a 1:20 em 146 (19,2%) dos caprinos e o teste alérgico revelou reações positivas (acima de 1,5 mm) em 168 (22,1%) dos animais. O teste alérgico, além de se mostrar mais sensível e específico para o diagnóstico da linfadenite do que a pesquisa de antitoxinas e o exame clínico, é sobretudo um método prático para a detecção de infecções precoces e confirmar suspeitas clínicas, a nível de campo.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Linfadenite caseosa, prevalência, métodos de diagnóstico.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 31 de julho de 1989.

<sup>2</sup> Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851.

<sup>3</sup> Instituto de Biologia, UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851.

### INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa de caprinos e ovinos é doença cosmopolita que se caracteriza por abscedações de linfonodos, mais raramente de lesões viscerais causadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A maioria dos animais afetados não apresenta distúrbios de ordem geral.

A prevalência da linfadenite caseosa em rebanhos de caprinos varia muito, parecendo ser maior em criações confinadas ou quando os animais são mantidos em pastagens mas durante a noite recolhidos em abrigos coletivos do que em rebanhos mantidos somente em pastagens (Silva 1972).

No Brasil a linfadenite caseosa dos caprinos está amplamente disseminada nas criações do nordeste, mas nos últimos anos a doença também vem sendo registrada em outras regiões do país. Na literatura científica Ramos (1949) assinalou a doença na zona sertaneja do nordeste, estimando que cerca de 50% dos caprinos estariam afetados pelo "mal do carozo". Posteriormente vários levantamentos confirmaram a ampla disseminação da linfadenite caseosa em caprinos, baseado no diagnóstico clínico e no exame bacteriológico, estimando-se prevalências de até 30% de animais portadores de linfonodos abscedados (Silva 1972, Costa et al. 1973, Costa Filho 1974, Silva et al. 1979, Silva & Silva 1982, Ribeiro et al. 1984, Unanian et al. 1985). Bento (1986) registrou a linfadenite caseosa em um rebanho leiteiro e Langenegger et al. (1988)

em 10 de 13 rebanhos na região sudeste e Kluppel et al. (1988), assinalaram a doença pela primeira vez na região sul.

No Brasil, apenas muito recentemente, foram empregados testes sorológicos e alérgico para avaliar a prevalência de infecções pré ou pós-clínicas, ou confirmar a linfadenite caseosa em animais portadores de lesões abscedantes em linfonodos externos e/ou internos, bem como em órgãos parenquimatosos. Almeida et al. (1983) utilizaram o teste de inibição da hemólise sinérgica (IHS) desenvolvido por Knight (1978) para a pesquisa de antitoxinas em caprinos infectados naturalmente com *C. pseudotuberculosis*. Brown & Alves (1984) e Brown et al. (1986) também no nordeste do Brasil, verificaram alta correlação entre o teste IHS e os achados clínicos de caprinos e ovinos portadores de lesões nos linfonodos externos. Em dois rebanhos encontraram 28 e 10% de reagentes assintomáticos, respectivamente em caprinos e ovinos. Johnson et al. (1987) ensaiaram e compararam o teste de ELISA em difusão em gel (DIG-ELISA) com o teste de IHS e concluíram que o mesmo é apropriado para triagem sorológica de rebanhos caprinos infectados com linfadenite caseosa.

Costa Filho (1977/78), utilizando uma sensítiva preparada com suspensão de cultura fenolada de *C. pseudotuberculosis* e *C. pyogenes*, obteve reações alérgicas em 10 caprinos naturalmente infectados portadores de lesões da linfadenite. Langenegger et al. (1987, 1988) desenvolveram um teste alérgico com a sensítiva denominada "linfadenina" a partir da proteína hidrossolúvel extraída de *C. pseudotuberculosis*, que se revelou sensível e específico, comprovado em 40 caprinos portadores de lesões da linfadenite caseosa e em 40 animais de rebanhos indenes.

Langenegger & Langenegger (1989), monitorando clínica, sorológica e alérgicamente caprinos infectados experimentalmente, verificaram que houve resposta imunológica humoral e mediada por células, simultaneamente; que a resposta imunológica foi mais elevada na fase pré-clínica; que apenas cerca de 1/3 das infecções evoluíram para a forma da doença clínica e que ocorreram autocuras, após ter havido altos títulos de anticorpos humorais e acentuada sensibilidade alérgica, sem ter tido lesões visíveis de linfadenite caseosa.

Como no Estado do Rio de Janeiro vem-se desenvolvendo a caprinocultura de leite, em boa parte já bastante tecnicizada, houve interesse em saber a prevalência da linfadenite caseosa e avaliar em rebanhos, comparativamente, os resultados do exame clínico, do teste da IHS e da prova alérgica, visando o aperfeiçoamento do diagnóstico e do combate à doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram escolhidos, aleatoriamente, 13 rebanhos sediados em torno da cidade do Rio de Janeiro, na Baixada Fluminense e na região serrana, município de Petrópolis. Os rebanhos haviam em média 58 caprinos com mais de 6 meses de idade e eram constituídos, em parte por animais de raças puras como a Saanem, Toggen-

burg, Anglo-nubiana e Suíça-parda, e em parte por animais mestiços sem raça definida. A maioria dos produtores mantém os caprinos em semi-estabulação. A produção de leite e os períodos de lactação são muito variáveis.

Após a identificação de cada animal foram realizados, no campo:

- Exame clínico através da inspeção e palpação sistemática dos linfonodos pré-parotidianos, submandibulares, prescapulares, pré-femorais, popliteus, retromamários ou inguinais, registrando-se em protocolo as características das lesões dos linfonodos, inclusive as cicatrizes da pele resultante de abscessos anteriormente ulcerados.
- Teste alérgico através da linfadenização. Na altura do omoplata era depilada a área da pele de aproximadamente 4 cm de lado, medida a espessura da dobra da pele no local com cutímetro<sup>4</sup> e inoculada 0,1 ml da linfadenina (Langenegger et al. 1987) com seringa de tuberculização<sup>5</sup>. Após 48 horas foi feita a leitura com nova mensuração da pele. O aumento de espessura da dobra da pele (AEDP) até 0,9 mm era considerado negativo; de 1,0 a 1,4 mm suspeito e de 1,5 mm e mais foi interpretado como reação positiva.
- Sangria de cada animal. Em tubos Vacutainer foram colhidos cerca de 10 ml de sangue para obtenção de soro.

No laboratório foram pesquisadas antitoxinas nos soros através do teste da IHS e titulados nas diluições de 1:20 até 1:1280, seguindo a técnica de Knight (1978) descrita em Langenegger & Langenegger (1991).

## RESULTADOS

A pesquisa revelou que dos 13 rebanhos examinados, em 10 (77,0%) foram encontrados caprinos portadores de lesões da linfadenite caseosa e/ou reações sorológicas e/ou alérgicas positivas, indicando a existência da infecção por *C. pseudotuberculosis*. A prevalência média da infecção nestes 10 rebanhos foi de 29,4% dos animais, variando de 3,6% a 100% por rebanho. Em 3 rebanhos não foram encontrados caprinos infectados.

Considerando-se o conjunto dos 760 caprinos dos 13 rebanhos examinados, os 171 caprinos que apresentaram lesões e/ou reações positivas constituíram-se em 22,5% dos animais. O exame clínico revelou que 93 (12,2%) caprinos eram portadores de linfonodos abscedados e/ou portadores de cicatrizes na pele resultante de ulcerações anteriores de abscessos. O exame sorológico pelo teste da IHS acusou a presença de antitoxinas com título igual ou superior a 1:20 em 146 (19,2%) e o teste alérgico revelou reações positivas na linfadenização, com AEDP igual ou acima de 1,5 mm, em 168 (22,1%) dos caprinos.

As discordâncias entre o resultado dos três exames foram individualizadas no Quadro 1. O teste alérgico revelou 75 (9,8%) infecções assintomáticas e o teste de IHS 53 (7,0%).

<sup>4</sup> Federkutmeter (Cutímetro de Mola) H. Hauptner Catálogo nº 33865.

Endereço: Kuller Str. 38144, D-565 Solingen, RFA.

<sup>5</sup> "Syntena" - Ampullen-Tuberkulinspritze (Seringa de tuberculina para carpule) H. Hauptner Catálogo nº 33890.

Quadro 1. Variação dos resultados nos 3 métodos de diagnóstico nos caprinos dos 13 rebanhos

Rebanho (Nº de ordem)	Nº de caprinos por rebanho	Nº de caprinos com lesões	Nº de caprinos reagentes		Nº de caprinos		Resultados discordantes		
			IHS	Alérgico	Infectados	Negativos	Clínico	IHS	Alérgico
1	14	2	8	8	8	6	- 6	Q	Q
2	61	10	29	29	29	32	-19	Q	Q
3	43	5	6 <sup>a</sup>	6 <sup>(a)</sup>	7	36	- 2	- 1	-1
4	77	13	25	29	29	48	-16	- 4	0
5	98	Q	Q	0	Q	98	Q	Q	Q
6	82	1	3	3	3	79	- 2	0	Q
7	64	Q	Q	Q	Q	64	Q	Q	Q
8	55	Q	Q	Q	Q	55	Q	Q	Q
9	54	8	2	8	8	46	Q	- 6	Q
10	44	4	8	10	10	34	6	- 2	Q
11	54	21	21	20	21	30	Q	Q	-1
12	51	4	11	12	12	0	- 8	- 1	Q
13	12	25	33 <sup>(a)</sup>	43 <sup>(a)</sup>	44	61	-19	-11	-1
Totais		93(12,2%)	146(19,22%)	168(22,1%)	171(22,5%)	589(77,5%)	78(45,6%)	25(14,6%)	3(1,7%)

(a) Um resultado positivo foi negativo num e no outro vice-versa.

## DISCUSSÃO

A presente pesquisa veio revelar que a linfadenite caseosa dos caprinos já está bastante disseminada na caprinocultura de leite do Estado do Rio de Janeiro. Embora ainda com incidências muito variadas nos rebanhos, a doença já afetou 77,0% das criações e se manifestou em 12,2% dos animais na forma clínica, subindo a prevalência média para 22,5% dos caprinos infectados como revelaram os exames sorológicos e alérgicos. Estas técnicas de diagnóstico, ainda pouco utilizadas em nosso meio (Almeida et al. 1983, Brown & Alves 1984, Brown et al. 1986, Langenegger et al. 1988, Langenegger & Langenegger 1991), revelaram-se eficazes e muito práticas, pois permitem, por um lado, reconhecer precocemente os animais infectados (fase pré-clínica) o que permite separá-los dos animais sadios, cortando-se assim a cadeia de transmissão da doença no rebanho. Por outro lado, sabendo-se que parte dos caprinos reagentes pode vencer a infecção antes de desenvolver abscessos na sua forma clínica (Langenegger & Langenegger 1991), esta autocura pode ser monitorada, tanto pelo teste da IHS quanto pela prova alérgica, que demonstraram alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico.

O uso destas e outras técnicas sorológicas para o diagnóstico das infecções ainda assintomáticas no controle da doença em rebanhos vem sendo empregado também em outros países (Burrell 1981, Lund et al. 1982, Schreuder et al. 1986).

Na presente pesquisa foram realizadas comparativamente o exame clínico através da inspeção e palpação dos linfonodos, que em 45,6% dos animais infectados não revelou a presença de lesões nos linfonodos externos. Brown et al. (1986) encontraram dentre 186 caprinos sem lesões, de um rebanho contaminado, 53 (28,5%) reagentes positivos no teste da IHS. Burrell (1981) em dois rebanhos com 110 animais encontrou 36,3% e 42,7% de reagentes assintomáticos, respectivamente, com as técnicas

de inibição da hemólise em tubos e a imuno-difusão em gel.

A avaliação comparativa entre o teste da IHS e a prova alérgica revelou 14,6% de falhas para o teste da IHA e apenas 1,7% para a prova alérgica. Este resultado vem confirmar a tendência observada no monitoramento da infecção experimental (Langenegger & Langenegger 1989) em que se observou a queda de antitoxina no sangue mais acentuada nos casos clínicos, a medida que amadurecia a abscedação do linfonodo, enquanto o nível de sensibilidade alérgica permanecia ainda relativamente alto.

## REFERÊNCIAS

- Almeida M.C., Sawyer M. & Sawyer J. 1983. Utilização do teste de inibição de hemólise sinérgica na pesquisa de antitoxina contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. IX Congr. Lat. Am. Microbiol., S. Paulo, 9:212. (Resumo)
- Bento A.H.L. & Zoni M.S. 1986. Observações sobre a ocorrência da linfadenite caseosa em cabras confinadas no Estado do Rio de Janeiro. Rev. Bras. Med. Vet., Rio de J., 8:136-138.
- Brown C.C. & Alves S.F. 1984. Diagnóstico da linfadenite caseosa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) através do teste sorológico de inibição da hemólise sinérgica. XIX Congr. Bras. Med. Vet., Belém, p. 263. (Resumo)
- Brown C.C., Olander H.J., Zometa C. & Alves S.F. 1986. Serodiagnosis of inapparent caseous lymphadenitis in goats and sheep, using the synergistic hemolysis-inhibition test. Am. J. Vet. Res. 47:1461-1463.
- Burrell D.H. 1981. Caseous lymphadenitis in goats. Aust. Vet. J. 57:105-110.
- Costa A. D.M., Camara J.Q., Rocha J.V.N. & Martinez T.C.N. 1973. Linfadenite caseosa de caprinos no Estado da Bahia. Distribuição geográfica da doença. Bolm Inst. Biol. Bahia, Salvador, 12:1-7.
- Costa Fº G.A. 1974. Particularidades da linfadenite caseosa dos caprinos em Pernambuco e no Nordeste. Anais Esc. Sup. Vet. UFRPE, Recife, 1:9-23.
- Costa Fº G.A. 1977/78. Diagnóstico precoce da linfadenite caseosa dos caprinos através da intradermo-reação. Anais Esc. Sup. Vet. UFRPE, Recife, 2/3:151-170.
- Johnson E.H., Oliveira S.C., Ribeiro O.C. & Silva J.A.H. 1987. Serological detection of abscesses caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* using the DIG-ELISA. Proc. IV Int. Conf. on Goats, Brasília, p. 1358. (Resumo)

- Kluppel M.E.A., Warth J. F.G., Gonçalves M.L.L., Biesdorf S.M., Wouk F. & Rocha A. 1988. Linfadenite caseosa caprina no Estado do Paraná, Brasil. Anais XXI Congr. Bras. Med. Vet., Salvador, Resumo nº 9.
- Knight H.D. 1978. A serologic method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. Cornell Vet. 68:220-237.
- Langenegger C.H., Langenegger J. & Costa S.G. 1987. Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. Pesq. Vet. Bras. 7:27-32.
- Langenegger C.H., Langenegger J. & Scherer P.O. 1988. Diagnóstico comparativo da linfadenite caseosa em caprinos. Anais XXI Congr. Bras. Med. Vet., Salvador, Resumo nº 115.
- Langenegger C.H. & Langenegger J. 1989. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Pesq. Vet. Bras. 11(1/2):1-7.
- Lund A., Almlid T., Larsen H.J. & Stein T. 1982. Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in adult goats from a naturally infected herd. Acta Vet. Scand. 23:473-482.
- Ramos J.I. 1949. Linfadenite caseosa dos caprinos no Nordeste. Bolm Secret. Ind. Com. Est. Pernambuco, Recife, jul.-dez., p. 212-216.
- Ribeiro O.C., Silva J.A.H., Costa M.D.M. & Nascimento R.M. 1984. Verificação da ocorrência de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxigênicas no Nordeste. Anais XIX Congr. Bras. Med. Vet., Belém, p. 157. (Resumo)
- Schreuder B.E.C., Laak E.A. & Griesen H.W. 1986. An outbreak of caseous lymphadenitis in dairy goats: first report of the disease in the Netherlands. Vet. Quarterly 8:61-67.
- Silva F.M. 1972. Carço dos caprinos (linfadenite caseosa) no Estado de Pernambuco. Monografia, URPE, Recife.
- Silva J.A.H. Ribeiro O.C., Pereira Fº & Matos M.S. 1979. Ocorrência de linfadenite caseosa em caprino no município de Morro do Chapéu, Bahia, Brasil. Comunicado Técnico, EPABA, Salvador.
- Silva M.U.D. & Silva A.E.D.F. 1982. Linfadenite caseosa em caprinos: observações clínicas de 2 anos. Anais XVIII Congr. Bras. Med. Vet., Camboriú, p. 49. (Resumo)
- Unanian M.D., Silva A.E.D.F. & Pant K.P. 1985. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid North-East Brazil. Trop. Anim. Hlth Prod. 17:57-62.

## INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Cassia occidentalis* (Leg. Caes.) EM EQUÍNOS<sup>1</sup>

LUIZ F. IRIGOYEN<sup>2</sup>, DOMINGUITA L. GRAÇA<sup>3</sup> e CLAUDIO S. L. BARROS<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Irigoyen L.F., Graça D.L. & Barros C.S.L. 1991. [Experimental poisoning by *Cassia occidentalis* (Leg. Caes.) in horses.] Intoxicação experimental por *Cassia occidentalis* (Leg. Caes.) em equínos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 11(1/2):35-44. Dpto Patologia, Univ. Fed. Sta Maria, 97119 Santa Maria, RS, Brazil.

In experimental studies seven 12 to 30 year old horses were force-fed through a nasoesophagic tube with ground *Cassia occidentalis* seeds admixed in water. Four horses died after receiving seeds corresponding to 1.5, 1.75 and 2g of seeds per kg (respectively 0.15, 0.175 and 0.2 per cent) of their body weight. A fifth horse was killed *in extremis* after receiving 3g of seeds per kg of body weight. The clinical disease induced by the plant in these five horses had a course of 4 to 96 hours and included signs of depression, muscle tremors, incoordinated and swaying gait, tachycardia, dyspnea and increase in serum levels of creatine phosphokinase, aspartate transaminase and gamma glutamyl transferase. The main necropsy findings included a swollen liver with marked lobular pattern in the natural surface and a nutmeg aspect of the cut surface; reddening of the intestinal mucosa; hemorrhages in the adrenal glands; suffusions and hemorrhages in the epi- and endocardium; pulmonary congestion and edema. Histologically there was hepatocellular degeneration and necrosis associated, in some cases, with polymorphonuclear neutrophilic infiltrates. The skeletal muscles had variable degrees of degenerative and necrotic lesions. The clinic-pathological alterations observed in these five horses suggest hepatotoxic and myotoxic principles in the *C. occidentalis* seeds, and a cumulative effect in those animals which were exposed to doses over 1.75g/kg of their body weight, fractioned up to eight administrations. Two horses to which 1 and 2g of the seeds per kg were fed, survived. The horse which received 1g of the ground seeds per kg presented a mild muscular disfunction and recovered completely. These two horses were killed for post-mortem examination 30 days after they had received the last administration of seeds. Necropsy findings were negative, and no lesions which could be attributed to the effects of the plant were observed on histopathological examination.

**INDEX TERMS:** Poisonous plants, Leguminosae Caesalpinoideae, *Cassia occidentalis*, *Senna occidentalis*, pathology, equine disease, toxic liver lesions, toxic myopathy.

**SINOPSE.-** Num estudo experimental sete equínos com idades entre 12 e 30 anos receberam, via sonda naso-esofágica, sementes de *Cassia occidentalis*, trituradas e misturadas com água. Quatro equínos morreram após receberem 1,5, 1,75 e 2g de sementes por kg de seu peso corporal. Um quinto equíno foi sacrificado *in extremis* após ter recebido 3g de sementes por kg. A doença induzida pela planta nesses cinco equínos teve uma evolução de 4 a 96 horas e incluiu sinais clínicos tais como: abatimento, tremores musculares, incoordenação motora, andar cambaleante, taquicardia, dispnéia e elevação dos níveis séricos das enzimas creatina fosfoquinase, aspartato transaminase e gama glutamyl transferase. Os achados de necropsia mais importantes foram fígado tumefeito e com acentuação do padrão lobular na superfície natural e aspecto de noz moscada na superfície de corte; aver-

melhamento da mucosa intestinal; hemorragias na superfície de corte das adrenais; hemorragias subepicárdicas e subendocárdicas; congestão e edema pulmonar. Histologicamente, havia degeneração e necrose hepatocelulares acompanhadas, em alguns casos, por infiltrado polimorfonuclear neutrofilico. Na musculatura esquelética havia lesões degenerativas e necróticas em graus variáveis. As alterações clínico-patológicas apresentadas por esses cinco equínos, sugerem uma ação hepatotóxica e miotóxica dos princípios químicos contidos nas sementes, bem como um efeito acumulativo nos animais que receberam dosagens acima de 1,75g/kg repartidas em até oito administrações. Dois equínos que receberam 1 e 2g de sementes por kg do peso corporal, sobreviveram. O equíno que recebeu 1g/kg, apresentou leve disfunção muscular e recuperou-se completamente. Esses dois equínos foram sacrificados e necropsiados 30 dias após a última administração das sementes. À necropsia e exame histopatológico não se evidenciaram lesões macro e microscópicas que pudessem ser associadas à planta.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Plantas tóxicas, Leguminosae Caesalpinoideae, *Cassia occidentalis*, *Senna occidentalis*, patologia, doenças de equínos, lesões hepáticas tóxicas, miopatia tóxica.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 1 de agosto de 1989.

Esse trabalho é parte da tese de mestrado, Área de Patologia Animal, do primeiro autor. Financiada pela FAPERGS, Projeto 227/88.

<sup>2</sup> Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97119 Santa Maria, RS.

<sup>3</sup> Departamento de Patologia, UFSM, 97119 Santa Maria, RS.

## INTRODUÇÃO

Os efeitos tóxicos da planta *Cassia occidentalis* L.<sup>4</sup> têm sido descritos em vários países; destacam-se entre eles miopatias e cardiomiopatias degenerativas em várias espécies animais. Casos espontâneos da intoxicação têm sido descritos em bovinos (Henson et al. 1965, Pierce & O'Hara 1967, Barros et al. 1989), suínos (Colvin et al. 1986, Martins et al. 1986) e eqüinos (Brocq-Rousseau & Bruère 1925, Moussu 1925). A reprodução experimental foi relatada em bovinos (Dollahite & Henson 1965, Henson & Dollahite 1966, Mercer et al. 1967, Read et al. 1968, O'Hara et al. 1969, O'Hara et al. 1970, Rogers et al. 1979), suínos (Colvin et al. 1986, Martins et al. 1986), ovinos (Dollahite et al. 1964, Dollahite & Henson 1965), caprinos (Dollahite et al. 1964, Dollahite & Henson 1965, Suliman et al. 1982), aves (Simpson et al. 1971, Torres et al. 1971, Graziano et al. 1983, Herbert et al. 1983), coelhos (Dollahite & Henson 1965, O'Hara & Pierce 1974a,b) e eqüinos (Moussu 1925, Martin et al. 1981).

A planta é uma leguminosa anual encontrada em pastagens, ao longo de beira de estradas ou em lavouras de milho, soja e sorgo (Schmitz & Denton 1977, Lorenzi 1982, Colvin et al. 1986), em pastagens de várzeas ou em solos ricos fertilizados (O'Hara et al. 1969). Dentre o gênero *Cassia*, a *C. occidentalis* é uma das espécies mais freqüentemente encontradas no Rio Grande do Sul (Torres et al. 1971, Lorenzi 1982). Folhas, caules, vagens e sementes são tóxicas (Dollahite et al. 1964, Henson & Dollahite 1966, Mercer et al. 1967), mas nas sementes a toxidez é maior (Dollahite et al. 1964, Henson & Dollahite, 1966, Martin et al. 1981).

Embora os sinais clínicos e lesões macro e microscópicas induzidas na intoxicação experimental por *C. occidentalis* em ruminantes, suínos, aves e coelhos, tenham sido adequadamente estudados, o mesmo não acontece com os eqüinos. A documentação da intoxicação nessa espécie é esparsa. Dois estudos antigos (Brocq-Rousseau & Bruere 1925, Moussu 1925) não descrevem o quadro anatomopatológico completo e um trabalho mais recente (Martin et al. 1981) descreve a intoxicação experimental em apenas três animais.

Há evidências de que a doença espontânea tenha ocorrido em eqüinos no Rio Grande do Sul, através da ingestão de sorgo contaminado por sementes de *C. occidentalis* (Barros et al. 1990).

Os objetivos da presente investigação foram os de determinar experimentalmente as doses tóxicas da planta e verificar o seu poder acumulativo, estabelecer o quadro clínico e anatomopatológico da intoxicação em eqüinos bem como estabelecer comparações desses quadros com os observados na intoxicação por *C. occidentalis* em bovinos e outras espécies animais, pesquisar as alterações

enzimáticas, no soro dos animais intoxicados, que possam contribuir como meio de diagnóstico auxiliar para o reconhecimento da doença, e contribuir para o entendimento da patogenia da intoxicação na espécie eqüina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados no experimento, sete eqüinos entre fêmeas e machos castrados, com idades entre 10 e 30 anos e com pesos entre 285 e 405 kg (Quadro 1). Antes do início do experimento os animais foram confinados em estábulos de alvenaria com piso de cimento e alimentados com feno de alfafa por 5 dias. Nesse período foram observados clinicamente e identificados através da numeração de 1 a 7. Durante o experimento os animais tinham acesso ao feno de alfafa e água à vontade.

As sementes utilizadas no experimento provinham de uma partida de sorgo que fora utilizada na suplementação alimentar de bovinos e eqüinos, e que causou um quadro de intoxicação espontânea nessas espécies (Barros et al. 1989). As sementes de *Cassia occidentalis* administradas aos sete eqüinos foram separadas manualmente do sorgo contaminado, trituradas em moedor de cereais, no máximo 24 horas antes da administração, e misturadas em água imediatamente antes da administração por sonda nasoesofágica. As quantidades de sementes administradas bem como o número de administrações e percentagem da semente em relação ao peso do animal, constam do Quadro 1.

Todos os animais foram examinados clinicamente em bases diárias considerando-se, principalmente, o apetite, movimentos respiratórios e cardíacos, a disposição a movimentar-se e o funcionamento do sistema muscular. Os animais foram exercitados diariamente por um período de 10 minutos.

Para os exames bioquímicos do soro, foram colhidos 10ml de sangue por punção da jugular. As coletas de sangue foram feitas antes da administração das sementes (considerado o dia zero da colheita) e diariamente até a morte dos animais; dos eqüinos 4 e 7, foram feitas até o dia 11 e 19 respectivamente. Após centrifugação, o soro foi congelado a -20°C até a realização dos exames. Para as determinações da aspartato transaminase (AT)<sup>5</sup> foi utilizado o kit Labtest<sup>6</sup> pelo método Reitman e Frankel com leituras num aparelho Spectronic 21<sup>7</sup>. Para as determinações da creatina fosfoquinase sérica (CPK) foi utilizado um kit CK-NAC-Merck-test<sup>8</sup> pelo método CK-NAC ativado com leituras feitas num aparelho Spectronic 2100 Clinical Analyser<sup>9</sup>. Para as determinações da gama glutamiltransferase (GGT) foi usado o kit monotest gama-GT novo, pelo método colorimétrico com leituras num enzímometro Spectronic 2100<sup>9</sup>.

O eqüino 1 foi sacrificado *in extremis* com injeção endovenosa de uma solução hipersaturada de sulfato de magnésio. Os eqüinos 4 e 7 foram sacrificados pelo mesmo método 30 dias após terem recebido a última administração da planta. Necropsias foram realizadas em todos os animais e foram colhidos fragmentos do miocárdio, pulmão, encéfalo, estômago, intestino, baço, fígado e rim. Foram também colhidos fragmentos dos músculos serrato cervical, vasto médio, semitendinoso, sartório, lombar, bíceps femoral,

5 Referida também na literatura como transaminase glutâmico oxaloacética sérica (TGOS ou SGOT)

6 Labtest, Sistemas Diagnósticos Ltda., Av. Isabel Bueno 948, Belo Horizonte, MG.

7 Bausch & Lomb, Milton Roy Company Analytical Products Division.

8 Merck S/A Indústrias Químicas, Estrada dos Bandeirantes 1099, Rio de Janeiro, RJ.

9 Bausch & Lomb, Milton Roy Company Analytical Products Division.

4 Sinonímia: *Senna occidentalis*; *C. falcata* L.; *C. geminiflora* Sohr; *C. linearis* Michx.; nomes vulgares: fedegoso, manjerioba, mamangá, lavapratos.

psaos, intercostais, vasto interno, supraespinhoso, glúteo médio, semimembranoso, reto interno, vasto lateral, diafragma, gastroc-semimembranoso, reto interno, vasto lateral, diafragma, gastrocnêmio e peitoral superficial. O material colhido foi fixado em sura de 5 micrômetros e corado pela Hematoxilina-Eosina (HE). Cortes de congelação do fígado de todos os animais foram corados pelo Sudan III.

## RESULTADOS

Nos Quadros 1, 2, 3 e 4, estão esquematizados os principais dados relativos aos resultados dos experimentos realizados em equínos com *Cassia occidentalis*. Pormenores sobre esses experimentos aparecem nos resumos dos protocolos transcritos a seguir:

Quadro 1. Quantidades de sementes administradas e tempo de sobrevivência dos equínos que receberam sementes de *Cassia occidentalis*

Equino nº	Peso corporal kg	Doses diárias g/kg	Número de administrações	Doses totais g/kg	Porcentagem da planta em relação ao peso corporal do animal %	Tempo decorrido entre à última administração e a morte (horas)
1	333	3,0	1	3,0	0,3	27 <sup>a</sup>
2	405	2,0	1	2,0	0,2	60
3	356	1,5	1	1,5	0,15	52
4	285	1,0	1	1,0	0,1	Sobreviveu <sup>b</sup>
5	300	0,5	4	2,0	0,2	24
6	304	0,25	7	1,75	0,175	17
7	290	0,125	16	2,0	0,2	Sobreviveu <sup>b</sup>

a Sacrificado *in extremis*.

b Sacrificado 30 dias após a última administração das sementes.

Quadro 2. Intoxicação experimental por *Cassia occidentalis* em equínos. Sinais clínicos, evolução e achados de necropsia

Equino nº	Dosagem total, porcentagem das sementes em relação ao peso corporal (%)	Sinais clínicos	Tempo decorrido entre o aparecimento dos sintomas e a morte (horas)	Achados de necropsia
1	0,3	Sudorese, tremores generalizados, incoordenação motora, andar cambaleante, respiração ofegante, gemidos, taquicardia e taquipnéia.	4 <sup>a</sup>	Bom estado de nutrição. Fígado marrom-amarelado e com aspecto de noz moscada.
2	0,2	Abatimento, respiração ofegante, taquicardia, tremores musculares, incoordenação motora, andar cambaleante, quedas freqüentes, dispnéia.	20	Bom estado de nutrição. Hemorragias subepicárdicas. Congestão e edema pulmonar. Fígado congesto com acentuação do padrão lobular e aspecto de noz moscada. Hemorragias nas adrenais.
3	0,15	Abatimento, dispnéia, incoordenação motora, andar cambaleante, respiração ofegante, salivação, taquicardia.	13	Bom estado de nutrição. Hemorragias no endo e epicárdio. Fígado com aspecto de noz moscada. Hemorragias nas adrenais.
4	0,1	Abatimento, andar trôpego, incoordenação motora.	Sobreviveu <sup>b</sup>	Fígado com leve aspecto de noz moscada.
5	0,2	Incoordenação motora, abatimento, dispnéia, relutância a movimentar-se, tremores musculares.	96	Sufusões e vfbices subendocárdicas e subepicárdicas. Fígado marrom-claro e aumentado de tamanho com bordos arredondados; com desenho da lobulação e aspecto de noz moscada.
6	0,175	Incoordenação motora, tremores musculares, perda do equilíbrio, dispnéia.	39	Icterícia moderada. Fígado com desenho da lobulação e aspecto de noz moscada. Hemorragias nas adrenais.
7	0,2	Não apresentou sinais clínicos.	Sobreviveu <sup>b</sup>	Bom estado de nutrição. Não foram observadas lesões macro ou microscópicas.

a Sacrificado *in extremis*.

b Sacrificado 30 dias após a última administração das sementes.

Quadro 3. Alterações histológicas do fígado dos eqüinos intoxicados experimentalmente por *Cassia occidentalis*

Eqüino nº	Dosagem total g/kg de peso corporal	Tumefação e vacuolização dos hepatócitos	Gotas hialinas	Necrose individual de hepatócitos	Necrose	Congestão centrolobular	Trombose centrolobular	Infiltrado neutrofilico	Hemosiderose
1	3	+++ <sup>a</sup>	+	-	-	+	+	-	++
2	2	+++	++	++	-	+++	-	+	++
3	1,5	++	(+)	+	+	+++	-	-	++
4	1	-	-	-	-	+	-	-	++
5	2	+++	+++	+++	-	(+)	+	+++	+
6	1,75	+++	++	-	+	+++	+	+	-
7	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> +++ Lesão acentuada, ++ moderada, + leve, (+) discreta, - ausência de lesão.

Quadro 4. Grau de intensidade das lesões observadas nos músculos estudados, dos eqüinos intoxicados experimentalmente por *Cassia occidentalis*

Músculo	Eqüino nº						
	1	2	3	4	5	6	7
Serrato cervical	+ <sup>a</sup>	-	(+)	-	(+)	-	-
Vasto médio	-	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-
Semitendinoso	-	(+)	-	-	-	-	-
Sartório	-	(+)	(+)	-	-	(+)	-
Lombar	+	-	+	-	-	(+)	-
Bíceps femoral	(+)	(+)	++	-	(+)	-	-
Psoas	(+)	-	++	-	+	(+)	-
Intercostais	(+)	(+)	-	-	-	-	-
Vasto interno	(+)	-	-	-	+	(+)	-
Supra espinhoso	-	-	(+)	-	(+)	-	-
Glúteo médio	(+)	-	(+)	-	-	(+)	-
Semimembranoso	(+)	-	-	-	(+)	(+)	-
Reto interno	(+)	-	(+)	-	(+)	-	-
Diafragma	+	-	(+)	-	(+)	+	-
Gastrocnêmio	-	+	-	-	(+)	-	-
Vasto lateral	-	-	-	-	-	-	-
Peitoral superficial	(+)	(+)	(+)	-	(+)	+	-

<sup>a</sup> ++ Lesão moderada, + leve, (+) discreta, - ausência de lesão.

**Eqüino 1**, fêmea, 12 anos, 333kg, recebeu uma única administração de 999g (correspondendo a 3g/kg de peso corporal) de sementes de *C. occidentalis*. **Sinais clínicos:** 23 horas após a administração das sementes começou a apresentar tremores generalizados com movimentos bruscos de elevação da cabeça e sudorese intensa. Permanecia em estação com os membros posteriores afastados lateralmente. Mostrou incoordenação dos membros posteriores e recusava-se a movimentar-se. Quando forçado ao exercício perdia o equilíbrio. Apresentou decúbito lateral, taquicardia e taquipnéia. A respiração era ofegante e gemia com frequência. Tentou levantar-se em várias oportunidades sem conseguir e, ao tentar, batia a cabeça contra o piso do estábulo. Foi sacrificado em estado agonizante 27 horas após a administração das sementes. **Patologia clínica:** mostrou elevação da enzima gama glutamiltransferase (GGT), de 4,2U/l (valor obtido na colheita pré-experimento ou dia 0) para 6,3U/l na última colheita (Fig. 1), elevação da aspartato transaminase (AT), de 100 para 190U/l (Fig. 2) e diminuição da creatina fosfoquinase (CPK) de 25 para 24U/l (Fig. 3). **Achados de necropsia:** animal em bom estado de nutrição. Fígado com coloração marrom-amarelada e aspecto de noz moscada. A musculatura apresentava coloração normal. **Exame histológico:** o fígado mostrava tumefação generalizada de hepatócitos. Os hepatócitos da área médio-zonal apresentavam diminutas gotas hialinas no citoplasma que determinavam um aspecto granular ao mesmo. Muitos hepatócitos de localização periportal mostravam moderada vacuolização em pequenas gotas que, pela coloração de Sudan, revelaram conter gordura. Congestão dos vasos do espaço porta. Congestão centrolobular com formação de trombos em algumas das veias. Moderada hemossiderose de localização difusa. **Coração** com moderada tumefação de fibras, algumas com degeneração hialina segmentar. **Pulmão** congesto. As alterações histológicas observadas nos músculos esqueléticos eram de discretas a leves e foram observadas nos seguintes grupos musculares: serrato cervical, lombar, bíceps femoral, psoas, intercostais, reto interno, glúteo médio, semimembranoso, diafragma e peitoral superficial. As alterações eram geralmente de natureza segmentar e caracterizavam-se por tortuosidade, tumefação de fibras e hipercontração segmentar. Algumas fibras mostravam-se hialinizadas ou com material flocular eosinofílico intracitoplasmático (degeneração flocular).

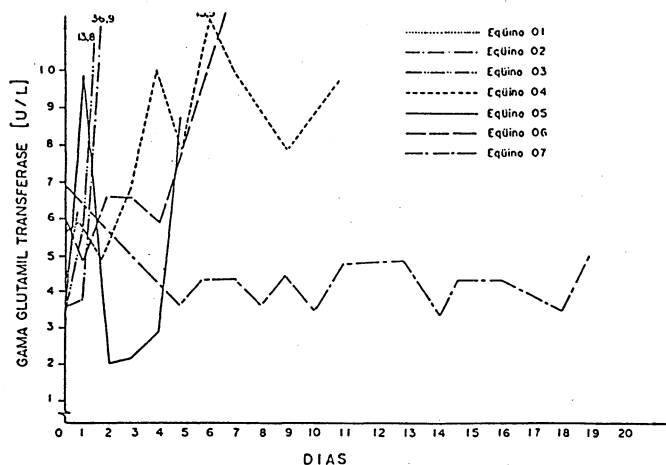


Fig. 1. Níveis séricos da enzima gama glutamiltransferase (GGT) nos eqüinos que receberam sementes de *Cassia occidentalis*. O dia zero corresponde à colheita de sangue pré-experimento.

**Eqüino 2**, fêmea, 30 anos, 405kg, recebeu uma única administração de 810g (correspondendo a 2g/kg do peso corporal) de sementes de *C. occidentalis*. **Sinais clínicos:** 40 horas após a administração das sementes mostrou abatimento, respiração ofegante e taquicardia. O quadro evoluiu para tremores musculares, andar cambaleante e incoordenação motora. A sintomatologia acentuava-se ao ser exercitado, perdendo o equilíbrio e caindo em várias oportunidades. Quando em estação permanecia com os membros posteriores afastados lateralmente, com a cabeça e pescoço abaixados e respirando com dificuldade. Permaneceu imóvel, em decúbito lateral direito

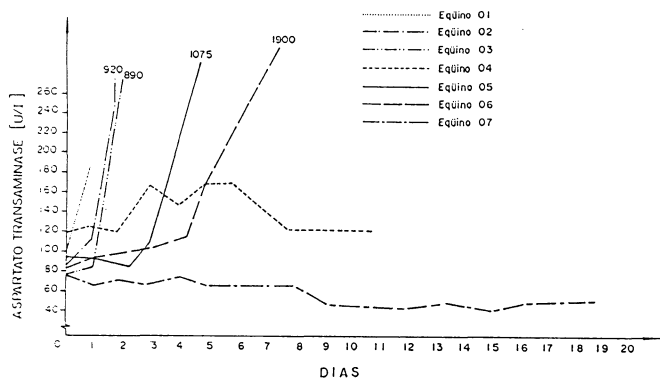


Fig. 2. Níveis séricos da enzima aspartato transaminase (AT) nos eqüinos que receberam sementes de *C. occidentalis*. O dia zero corresponde à colheita de sangue pré-experimento.

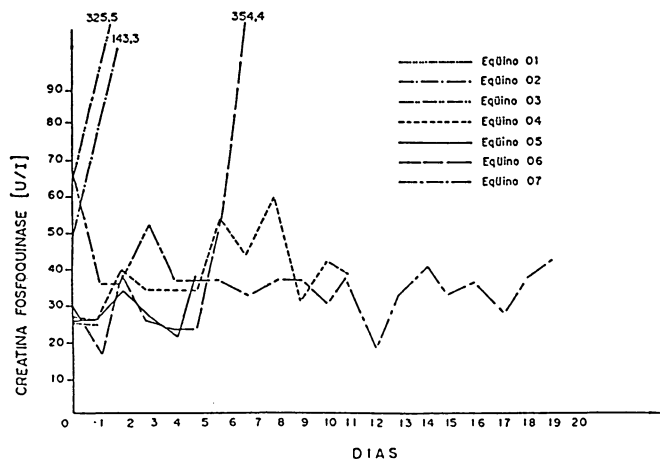


Fig. 3. Níveis séricos da enzima creatina fosfoquinase (CPK) nos eqüinos que receberam sementes de *C. occidentalis*. O dia zero corresponde à colheita de sangue pré-experimento.

até a morte, 60 horas após a administração das sementes. **Patologia clínica:** mostrou elevação da CPK, de 48,1U/l (pré-experimento) para 143,3U/l na última colheita (Fig. 3), elevação da GGT, de 3,7 para 36,9U/l (Fig. 1) e elevação da AT de 89 para 920UI (Fig. 2). **Achados de necropsia:** animal em bom estado de nutrição. Coração com petéquias e sufusões de localização subepicárdica, ao longo do sulco coronário. Pulmão avermelhado com crepitação diminuída, deixando fluir, ao corte, líquido amarelado e espumoso. Traquéia e brônquios principais com conteúdo amarelado e espumoso. Fígado congesto com acentuação do padrão lobular na superfície natural e marcante aspecto de noz moscada na superfície de corte. Adrenais com áreas focais avermelhadas na superfície de corte, atingindo a cortical e a medular. A musculatura apresentava coloração normal. **Exame histológico:** o fígado mostrava acentuada congestão centrolobular e tumefação de hepatócitos. Muitos hepatócitos de localização periportal apresentavam intensa vacuolização em grandes gotas que, pela coloração de Sudan, revelaram conter gordura. Foi observada necrose centrolobular com desaparecimento de hepatócitos e formação de pequenos lagos de sangue e leve infiltrado neutrofilico nas adjacências. Muitos hepatócitos com gotas hialinas no citoplasma e outros necróticos eram vistos disseminados pelo parênquima. Havia moderada hemossiderose de distribuição difusa. **Pulmão** com congestão, edema e infiltrado inflamatório neutrofilico intralveolar. **Adrenal** com focos hemorrágicos e pequenos focos necróticos na cortical e na medular. As alterações histológicas observadas nos músculos esqueléticos eram discretas, de natureza segmentar e foram observadas nos seguintes grupos musculares: vasto médio, semitendinoso, gastrocnêmio, peitoral superficial, sartório, intercostais e bíceps femoral. Essas alterações incluíam tumefação de fibras, hipercontração segmentar, degeneração hialina e degeneração floccular (Fig. 4).

**Eqüino 3**, macho castrado, 10 anos, 356kg, recebeu uma única administração de 534g (correspondendo a 1,5g/kg de peso corporal) de sementes de *C. occidentalis*. **Sinais clínicos:** 39 horas após a administração das sementes mostrou abatimento, respirava com dificuldade e permanecia em estação com os membros posteriores afastados lateralmente. Quando forçado ao exercício mostrou incoordenação motora e andar cambaleante. O quadro agravou-se progressivamente até o decúbito ventral. A respiração era ofegante e salivava intensamente. Entrou em decúbito lateral mostrando taquicardia e dispnéia até morrer, 52 horas após a administração das sementes. **Patologia clínica:** mostrou elevação da CPK de 63,2U/l (pré-experimento) para 325,5U/l na última colheita (Fig. 3), elevação da GGT de 3,4 para 13,8U/l (Fig. 1) e elevação da AT de 79 para 890UI (Fig. 2). **Achados de necropsia:** animal em bom estado de nutrição. Petéquias e sufusões no endo- e epicárdio. Fígado tumefeito, com acentuação do padrão lobular caracterizado por alternância de áreas vermelhas escuras com áreas amareladas. Essa aparência é vista também na superfície de corte o que confere a esta um aspecto de noz moscada (Fig. 8). Áreas focais avermelhadas na superfície de corte das adrenais atingindo a cortical. A musculatura apresentava coloração normal. **Exame histológico:** fígado com acentuada congestão centrolobular e necrose individual de hepatócitos na periferia. Tumefação e vacuolização de hepatócitos principalmente em localização periportal. Pela coloração de Sudan III os vacúolos revelaram conter gordura. Algumas áreas centrolobulares mostravam necrose com desaparecimento de hepatócitos e formação de pequenos lagos de sangue. Foi detectada moderada hemossiderose de localização difusa. Alguns hepatócitos exibiam gotas hialinas citoplasmáticas. **Adrenal:** hemorragia difusa na cortical. As alterações histológicas dos músculos esqueléticos eram de discretas a moderadas. Observaram-se fibras tumefeitas e hialinizadas no serrato cervical, sartório,

reto interno, glúteo médio, diafragma, lombar e peitoral superficial. O vasto médio exibia edema intersticial, fibras com hipercontração segmentar e fibras tortuosas. O bíceps femoral (Fig. 5) e o psoas apresentaram edema intersticial e fibras tumefeitas e hialinizadas.

**Eqüino 4**, fêmea, 25 anos, 285kg, recebeu uma única administração de 285g (correspondendo a 1g/kg de peso corporal) de sementes de *C. occidentalis*. **Sinais clínicos:** 140 horas (6 dias) após a administração das sementes, encontrava-se abatido e com andar trôpego. Os sinais evoluíram para incoordenação motora, ao andar arrastava a ponta dos cascos posteriores e o abatimento era evidente. Em torno de 24 horas após ter apresentado esse quadro a sintomatologia foi desaparecendo progressivamente e o animal começou a recuperar seu estado geral. Foi sacrificado para exame anatomo-patológico 30 dias após a administração das sementes, sem que voltasse a apresentar qualquer sintoma. **Patologia clínica:** mostrou elevação da CPK de 27,4U/l (valor obtido na colheita pré-experimento) para 38,4U/l na última colheita (Fig. 3), elevação da GGT, de 5,5 para 10U/l (Fig. 1) e elevação da AT de 119 para 121UI (Fig. 2). **Achados de necropsia:** fígado com aspecto de noz moscada na superfície de corte. A musculatura apresentava coloração normal. **Exame histológico:** o fígado mostrou discreta congestão centrolobular e hemossiderose moderada. O exame da musculatura esquelética não revelou alterações microscópicas.

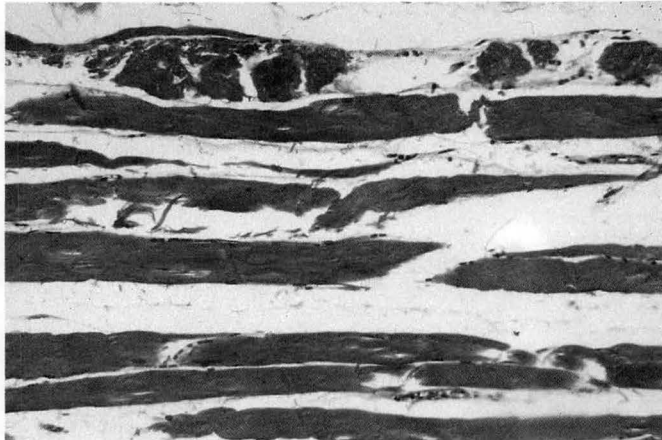
**Eqüino 5**, macho castrado, 15 anos, 300kg, recebeu diariamente 150g (correspondendo a 0,5g/kg) de sementes de *C. occidentalis* até completar, em 4 administrações, a dose total de 600g de sementes ou 2g/kg do peso corporal. **Sinais clínicos:** 24 horas após a primeira administração das sementes, foi observado que arrastava a ponta dos cascos posteriores ao andar. Após a segunda administração, o quadro clínico agravou-se aparecendo marcada incoordenação dos membros posteriores e abatimento. Após a terceira administração e havendo completado 1,5g/kg, mostrou dispnéia, incoordenação motora e relutância a movimentar-se; quando forçado ao exercício, respondia agressivamente. Após a última administração e havendo ingerido a dose total de 2g/kg, permaneceu imóvel, com tremores musculares, principalmente nos membros posteriores. No 5º dia após o início do experimento entrou em decúbito lateral, em estado agonizante e respirando com dificuldade. Morreu 5 dias após o início do experimento e 24 horas após a última administração das sementes. **Patologia clínica:** mostrou elevação da CPK, de 26U/l (valor obtido na colheita pré-experimento ou dia 0) para 38,4U/l na última colheita (Fig. 5), elevação da GGT, de 3,3 para 8,5U/l (Fig. 1) e elevação da AT de 25 para 1075UI (Fig. 2). **Achados de necropsia:** sufusões e vólcres subepicárdicas e subepicárdicas. Fígado discretamente aumentado de tamanho, com bordos levemente arredondados e coloração marrom-clara. O desenho da lobulação na superfície natural era evidente, com áreas avermelhadas alternadas com a cor marrom-clara predominante; esse aspecto de noz moscada era visto também na superfície de corte. **Exame histológico:** fígado com discreta congestão centrolobular e trombos em algumas das veias. Acentuada tumefação e vacuolização de hepatócitos em localização principalmente periportal (Fig. 10). Esses vacúolos, pela coloração de Sudan III, revelaram conter gordura. Muitos hepatócitos mostraram presença de esférulas hialinas no citoplasma. Foram observados múltiplos focos de neutrófilos disseminados pelo parênquima e muitos hepatócitos necróticos distribuídos aleatoriamente pelo lóbulo. **Coração:** mostrou fibras tumefeitas e miofibrilas separadas, deixando espaços

claros entre elas (Fig. 7). As alterações histológicas observadas nos músculos esqueléticos variavam de discretas a leves. Fibras envolvidas pertenciam aos músculos serrato cervical, bíceps femoral, vasto interno, reto interno, diafragma, gastrocnêmio, peitoral superficial, vasto médio, psoas, supraespinhoso e semimembranoso. As alterações eram de natureza segmentar e caracterizavam-se por tumefação, hipercontração segmentar, hialinização e degeneração flocular.

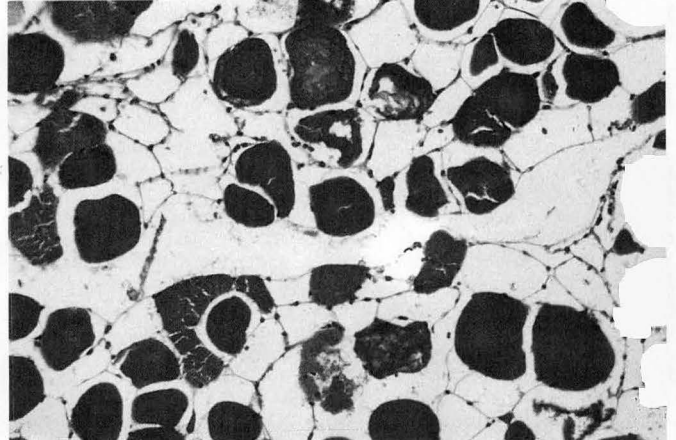
**Equino 6**, fêmea, 30 anos, 304kg, recebeu diariamente 76g (correspondendo a 0,25g/kg) de sementes de *C. occidentalis* até completar, em 7 administrações, a dose total de 532g de sementes ou 1,75g/kg do peso corporal. **Sinais clínicos:** 122 horas após a primeira administração e havendo completado 1,5g/kg (6 administrações de sementes), mostrou incoordenação motora, notadamente dos membros posteriores. Apresentou tremores musculares nos membros posteriores e perdia o equilíbrio quando forçado ao exercício. Após receber a sétima e última administração, entrou em decúbito lateral esquerdo, mostrando dispnéia. Assim permaneceu até a morte, 6 dias e 17 horas após o início do experimento e 17 horas após a última administração das sementes. **Patologia clínica:** mostrou elevação da CPK, de 30,2U/l (valor obtido na colheita pré-experimento ou dia 0) para 354,4U/l na última colheita (Fig. 3), elevação da GGT, de 6,1 para 17,3U/l (Fig. 1) e elevação da AT de 83 para 1900UI (Fig. 2). **Achados de necropsia:** mucosas externas, gordura do tecido subcutâneo e das cavidades torácica e abdominal, moderadamente amareladas. Fígado de cor marrom-amarelada, com nítido desenho da lobulação na superfície natural e acentuado aspecto de noz moscada na superfície de corte. Avermelhamento da mucosa da bexiga. Áreas avermelhadas na superfície de corte da adrenal. A musculatura apre-

sentava coloração normal. **Exame histológico:** o fígado mostrava intensa congestão centrolobular com formação de trombos em algumas veias. Tumefação e vacuolização generalizada de hepatócitos. Essa vacuolização era mais acentuada na zona periférica do lóbulo. Esses vacúolos, pela coloração de Sudan III, revelaram conter gordura (Fig. 9). Muitos hepatócitos exibiam gotas hialinas no citoplasma. Foram observadas áreas de necrose centrolobular com desaparecimento de hepatócitos e focos de infiltrado neurotrófico disseminados pelo parênquima (Fig. 11). **Adrenal:** hemorragias na cortical. O exame da musculatura esquelética mostrou fibras tumefeitas nos músculos vasto médio e lombar. Os músculos psoas, semimembranoso e peitoral superficial exibiram fibras tumefeitas e hialinizadas. O sartório apresentou fibras fragmentadas e fibras tumefeitas, o vasto interno, fibras tortuosas e fibras com hipercontração segmentar. O glúteo médio mostrou fibras fragmentadas, fibras com agregações acidofílicas e fibras tortuosas. O diafragma exibiu fibras tumefeitas, hialinizadas e fibras fragmentadas (Fig. 6).

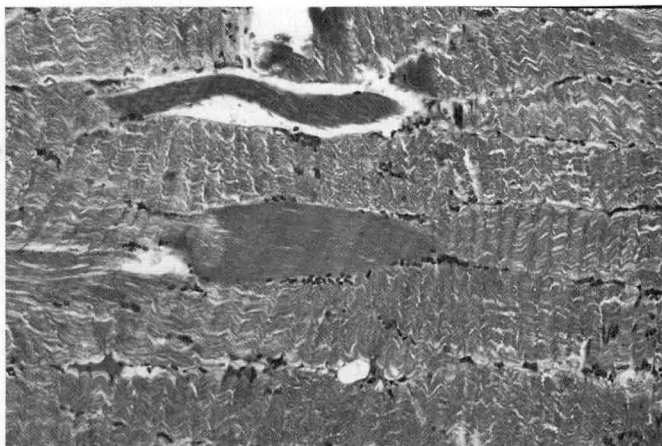
**Equino 7**, macho castrado, 14 anos, 290kg, recebeu diariamente 36g (correspondendo a 0,125g/kg) de sementes de *C. occidentalis* até completar, em 16 administrações, a dose total de 580g de sementes ou 2g/kg do peso corporal. **Sinais clínicos:** não apresentou quaisquer sintomas até ser sacrificado 30 dias após a última administração das sementes. **Patologia clínica:** mostrou diminuição da CPK, de 67,3U/l (valor obtido na colheita pré-experimento ou dia 0) para 39,8U/l na última colheita realizada 19 dias após o início do experimento (Fig. 3), diminuição da GGT, de 6,9 para 5,3U/l (Fig. 1) e diminuição da AT de 79 para 59UI (Fig. 2). **Achados de necropsia:** animal em bom estado de nutrição. Não foram observadas lesões macroscópicas.



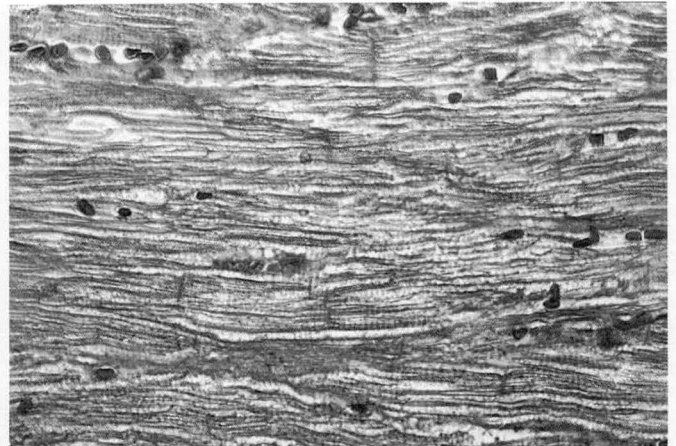
4



5



6



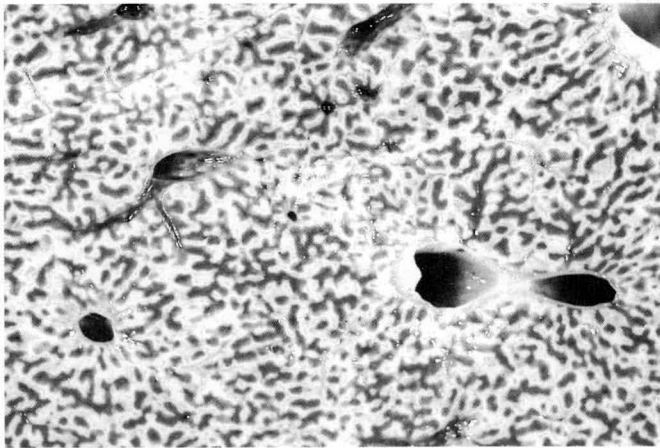
7

Fig. 4. Tumefação e fragmentação segmentares de fibra muscular esquelética, em músculo intercostal. Agregações eosinofílicas (degeneração flocular) são vistas com distribuição segmentar na fibra da parte superior da fotografia (Equino 2). HE, obj. 16.

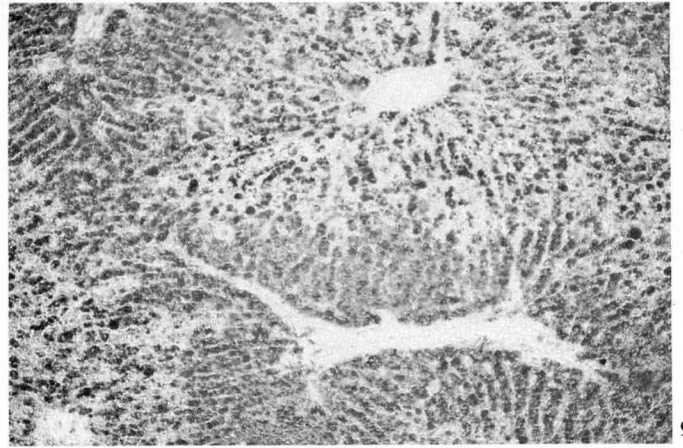
Fig. 6. Tumefação e hialinização segmentares de fibras musculares do diafragma, na intoxicação experimental por *C. occidentalis* (Equino 6). HE, obj. 16.

Fig. 5. Edema intersticial, tumefação, hialinização e vacuolização de fibras no corte transversal do músculo bíceps femoral, na intoxicação experimental por *C. occidentalis* (Equino 3). HE, obj. 16.

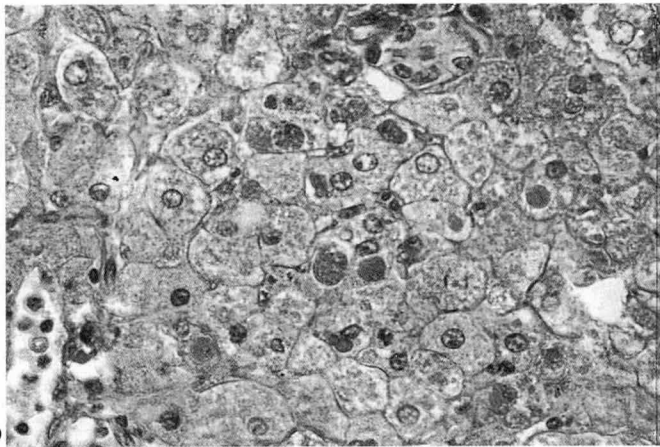
Fig. 7. Tumefação das fibras cardíacas caracterizada pela separação das miofibrilas, na intoxicação experimental por *C. occidentalis* (Equino 5). HE, obj. 6,3.



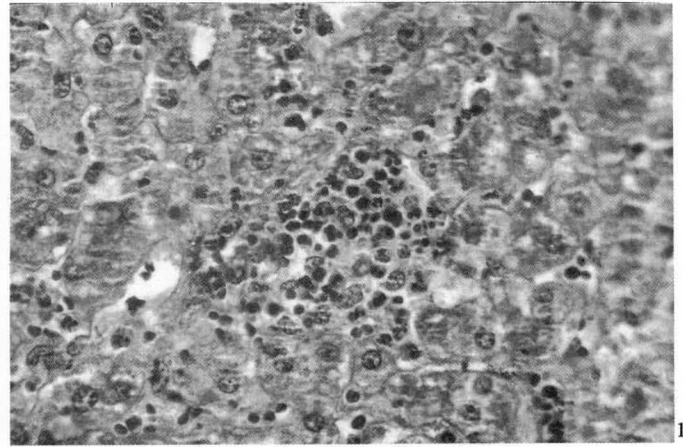
8



9



10



11

Fig. 8. A superfície de corte do fígado mostra aspecto de noz moscada, os centros dos lóbulos estão congestionados e circundados por halo claro amarelado, na intoxicação experimental por *C. occidentalis* (Equino 3).

Fig. 10. Acentuada tumefação, vacuolização e presença de esférulas hialinas no citoplasma de hepatócitos, na intoxicação experimental por *C. occidentalis* (Equino 5), HE, obj. 16.

Fig. 9. A distribuição da degeneração gordurosa no parênquima hepático, embora difusa, é mais acentuada na zona periportal do que no centro do lóbulo, na intoxicação experimental por *C. occidentalis* (Equino 6), Sudan III, obj. 6,3.

Fig. 11. Foco de infiltrado polimorfonuclear neutrofilico no parênquima hepático, na intoxicação experimental por *C. occidentalis* (Equino 6), HE, obj. 16.

picas. A musculatura esquelética apresentava coloração normal. Exame histológico: não foram observadas alterações microscópicas.

A urina dos sete equínos mostrou-se de coloração normal durante todo o experimento.

## DISCUSSÃO

*Cassia occidentalis* mostrou-se experimentalmente tóxica para equínos. Quantidades de sementes da planta correspondentes a 3, 2, 1,75 e 1,5 g por kg (0,3, 0,2, 0,175 e 0,15% do peso corporal, respectivamente) do peso dos animais provocaram a morte com sintomas e quadro anatomopatológico compatíveis com o da intoxicação por *C. occidentalis* em equínos (Quadros 1 e 2). Nos animais que morreram, o quadro clínico observado teve evolução de 4 a 96 horas (Quadro 2) e consistiu de abatimento, tremores musculares, incoordenação motora, andar cambaleante, taquicardia e dispnéia. A verificação do comportamento enzimático mostrou, nas últimas horas de vida, elevação da aspartato transaminase (AT) nos equínos que receberam dosagem entre 1,5 e 2g/kg do peso vivo, exceto o equino 7 (Fig. 2). Os equínos 2, 3 e 6

apresentaram marcada elevação da creatina fosfoquinase (CPK) na última verificação realizada poucas horas antes da morte (Fig. 3). O equino 2 mostrou marcada elevação da gama glutamiltransferase (GGT) poucas horas antes da morte (Fig. 4). Os achados de necropsia nos animais que morreram (Quadro 2) incluem fígado com acentuação do padrão lobular e aspecto de noz moscada, hemorragias na superfície de corte da adrenal, hemorragias subepicárdicas e subendocárdicas; congestão e edema pulmonar. No exame histológico havia no fígado (Quadro 3) lesões degenerativas e necróticas acompanhadas, em alguns casos, por infiltrado neutrofilico em graus variáveis. Na musculatura esquelética estudada havia lesões degenerativas e necróticas em graus que variavam de discretas a moderadas, tais como fibras tumefeitas, hialinizadas, tortuosas, fragmentação de fibras, outras com hipercontração segmentar ou com degeneração flocular.

O quadro anatomopatológico verificado nos animais desse estudo indicam que a intoxicação por *C. occidentalis* em equínos provoca um quadro principalmente he-

patotóxico. Observações semelhantes foram feitas por Martin et al. (1981). O efeito hepatotóxico de *C. occidentalis* tem sido observado por vários autores associado à intoxicação pela planta em bovinos (Dollahite & Henson 1965, Henson et al. 1965, Henson & Dollahite 1966, Mercer et al. 1967, Schmitz & Denton 1977, O'Hara et al. 1969, Rogers et al. 1979, Barros et al. 1989), caprinos (Suliman et al. 1982), suínos (Colvin et al. 1986, Martins et al. 1986), coelhos (O'Hara & Pierce 1974a) e aves (Torres et al. 1971, Graziano et al. 1983, Herbert et al. 1983). Outras espécies de *Cassia* têm sido descritas como produzindo lesões hepáticas em caprinos (El Sayed et al. 1983, Rowe et al. 1987) e bovinos (Rowe et al. 1987). A ocorrência da lesão hepática é atribuída por O'Hara et al. (1969) à insuficiência cardíaca congestiva devido à lesão produzida, no miocárdio, pela planta. Embora uma insuficiência circulatória contribua para as lesões hepáticas acredita-se que nos eqüinos 2, 3, 5 e que apresentavam uma lesão degenerativa difusa e grave, tenha ocorrido um efeito direto pela planta desde que a coloração pelo Sudan III revelou uma marcante predominância da esteatose na região periportal. As lesões degenerativas parecem evoluir da região periportal para a centrolobular, ao contrário do que poderia esperar-se se a lesão primária fosse centrolobular provocada por insuficiência circulatória. As inclusões ou corpúsculos acidofílicos (gotas hialinas) encontradas nos hepatócitos dos eqüinos 1, 2, 3, 5 e 6 são descritas como citossegrossomos, de natureza inespecífica, associados a células subletalmente lesadas por uma variedade de insultos como hipóxia, intoxicações, deficiências nutricionais e infecções víricas (Kelly 1985).

Adicionalmente ao quadro de hepatopatia, os eqüinos 1, 2, 3, 5 e 6 mostraram um quadro de miopatia, evidenciado pelos sinais clínicos de disfunção muscular e pelas lesões histológicas observadas na musculatura estudada. A lesão muscular mostrou-se, pelo menos morfológica-mente, de menor intensidade se comparada com a que ocorre em bovinos, onde o quadro principal da intoxicação é miotóxico. Enquanto nessa espécie a principal lesão macroscópica é a palidez em graus variados da musculatura esquelética, notadamente dos membros posteriores, e, em menor intensidade, do miocárdio (O'Hara et al. 1969), nos eqüinos deste estudo não se observaram essas alterações macroscópicas na musculatura esquelética e no miocárdio. Observações semelhantes foram feitas por Martin et al. (1981) na intoxicação experimental por *C. occidentalis* em eqüinos. Esses autores observaram lesões microscópicas na musculatura esquelética sem que fossem observadas alterações macroscópicas. Por outro lado, Colvin et al. (1986) em experimento realizado em suínos, observaram sinais clínicos evidentes de disfunção muscular que não tinham uma correlação direta com as lesões microscópicas. Enquanto a debilidade muscular, ataxia e prostração eram sinais proeminentes, as lesões microscópicas eram mínimas. Neste experimento observou-se situação semelhante, a sintomatologia de disfunção muscular foi evidente em todos os eqüinos (com exceção do

7) enquanto que as lesões microscópicas foram inconsistentes e de pouca intensidade nos músculos estudados. Além disso, verificou-se elevação dos níveis séricos da CPK em três eqüinos (Fig. 3), o que reforça o indicativo de lesão muscular (Pierce & O'Hara 1967, Duncan & Prasse 1982). As fibras musculares esqueléticas e cardíacas são ricas nessa enzima e processos degenerativos e necróticos que aumentam a permeabilidade da membrana celular promovem a liberação dessa enzima pela célula e sua conseqüente liberação para o soro. Elevação dos níveis séricos da AT foram também observadas em cinco eqüinos (Fig. 2). Embora o aumento da AT não indique especificamente lesão em determinado órgão, elevação dos níveis séricos dessa enzima ocorre em função de lesão do fígado, músculo esquelético e miocárdio. Lesões degenerativas nesses órgãos provocam liberação da enzima e sua determinação no soro, junto à CPK, pode ser usada para o diagnóstico das miopatias (Duncan & Prasse 1982). Entretanto, as graves lesões encontradas no fígado podem ter sido a principal causa da elevação da AT. A gama glutamiltransferase (GGT) é empregada como indicador de lesão hepática e, apesar de não ser específica do fígado, é uma enzima ligada à membrana celular e seus níveis são afetados pela necrose hepática aguda (Doxey 1985). No experimento verificou-se elevação marcante da GGT no eqüino 2 e, em menor grau, nos eqüinos 3, 4, 5 e 6 (Fig. 1).

Brocq-Rousseau & Bruère (1925) descreveram em eqüinos um surto de intoxicação espontânea por sementes de *C. occidentalis* misturada à aveia utilizada como ração e a reprodução experimental num eqüino, indicando um quadro clínico que incluía fraqueza e tremores musculares, enterite, anúria, sintomas nervosos, paralisia e morte. Não se observaram alterações musculares à necropsia e as únicas lesões descritas foram congestão intestinal e, às vezes, do pulmão. Os sintomas nervosos mencionados pelos autores, não observados neste experimento, talvez indicassem um quadro de modificação do comportamento causado pela dor provocada pela enterite ou pelas lesões degenerativas no fígado. Como os autores não relataram o exame histopatológico dos eqüinos intoxicados é provável que não fossem percebidas lesões hepáticas que poderiam provocar dor aguda.

Hemorragias na adrenal foram observadas em 3 dos 5 (60%) dos animais que morreram. Hemorragias da adrenal ocorrem frequentemente em eqüinos associadas ao quadro de choque toxêmico (Capen 1985). Portanto, embora essa lesão tenha sido encontrada com frequência alta nos eqüinos, não deve ser considerada como específica para a intoxicação por *C. occidentalis* nem atribuída à ação direta da planta.

Comparando-se os resultados deste estudo com aqueles obtidos por Martin et al. (1981) com *C. occidentalis* em eqüinos podem-se fazer as seguintes comparações: com relação ao quadro clínico, esses autores descreveram depressão, ataxia, incoordenação, prostração e morte, um quadro muito semelhante ao observado no presente expe-

rimento. É de interesse notar que, enquanto na intoxicação por *C. occidentalis* em bovinos, a diarreia é um achado clínico constante (Schmitz & Denton 1977, Barros et al. 1989), no presente estudo nenhum dos equínos apresentou esta sintomatologia. Observações semelhantes foram constatadas experimentalmente em equínos por Martin et al. (1981). Esses autores notaram também marcada elevação das enzimas CPK e AT num equino que recebeu a dose total de 1g/kg do peso corporal. A atividade enzimática verificada nos animais deste experimento mostrou um comportamento semelhante, com elevação das enzimas CPK, AT e, em menor grau, da GGT, na última colheita antes da morte (Fig. 3, 2 e 1). As lesões microscópicas observadas pelos mesmos autores incluíram necrose segmentar de fibras musculares esqueléticas, necrose hepática centrolobular e necrose focal do epitélio tubular renal. Neste experimento foram observadas lesões degenerativas e necróticas no fígado e na musculatura esquelética, em graus variáveis. Enquanto doses totais de 2 e 3,3g/kg do peso corporal causaram a morte em 130 e 50 horas respectivamente (Martin et al. 1981), no presente experimento doses totais de 2 e 3g/kg provocaram a morte em tempos aproximados (Quadro 1). A dose total de 3g/kg causou a morte do animal em 27 horas e a dose total de 2g/kg em 24 e 60 horas.

As sementes de *C. occidentalis* utilizadas neste experimento foram retiradas da mesma partida de sorgo contaminado que provocou um surto de intoxicação espontânea em bovinos e equínos, e foi utilizada na reprodução experimental da intoxicação em bovinos (Barros et al. 1989), um ano antes de ser utilizada neste experimento e manteve-se tóxica para equínos.

O efeito acumulativo da planta tem sido mencionado por alguns autores (Mercer et al. 1967, Rogers et al. 1969). Nos equínos 2 e 5 que receberam doses totais iguais de 2g/kg de peso corporal, porém repartidas em quatro administrações no caso do equino 5, o curso clínico e achados de necropsia foram semelhantes. O equino 6 que estava programado para receber 2g/kg em oito administrações, morreu antes de receber a última administração, havendo totalizado 1,75g/kg. O curso clínico e achados de necropsia foram em tudo semelhantes aos descritos para os equínos 2 e 5, o que reforça o indicativo do efeito acumulativo de *C. occidentalis*. O equino 7 que recebeu a dose total de 2g/kg em 16 administrações, provavelmente não adoeceu porque a dosagem diária foi insuficiente para se acumular em níveis tóxicos.

Em estudo realizado em bovinos, O'Hara et al. (1969) atribuíram a morte dos animais em seu experimento à insuficiência cardíaca congestiva devido às lesões degenerativas do miocárdio, refletida nos eletrocardiogramas anormais nos estágios terminais da doença e à congestão e edema pulmonares. Lesões degenerativas do miocárdio, associadas com a ingestão da planta têm sido estudadas em microscopia eletrônica em experimentos realizados em bovinos (Read et al. 1968, Rogers et al. 1979). Tumefação e degeneração das mitocôndrias, resultando em com-

pressão de miofibrilas, foram as alterações encontradas. Observações semelhantes foram feitas por Simpson et al. (1971) em estudo experimental em aves. Por outro lado, Rowe et al. (1987), em experimento com *Cassia roemeriana* em bovinos e caprinos obtiveram resultados muito semelhantes aos descritos na intoxicação por *C. occidentalis* nessas espécies. Os autores indicaram que a intoxicação por *C. roemeriana* pode resultar em disfunção cardíaca sem que existam lesões evidentes macro e microscópicas no miocárdio; indicaram ainda que as lesões cardíacas podem ser melhor evidenciadas na microscopia eletrônica. No presente experimento não foram observadas lesões muito evidentes do miocárdio na microscopia ótica, porém, é provável que ocorra uma lesão semelhante à observada por Rowe et al. (1987), na intoxicação por *C. occidentalis* em equínos. Tem sido sugerido que um fator tóxico presente na planta possa agir especificamente na mitocôndria do músculo cardíaco (Read et al. 1968, O'Hara & Pierce, 1974a). Acredita-se, entretanto, que na espécie equina é de importância para a causa mortis, o quadro hepatotóxico grave observado macro e microscopicamente.

Devido à natureza invasora de *C. occidentalis* em lavouras de soja, milho e sorgo (Lorenzi 1982), assume importância o uso de medidas profiláticas para evitar a contaminação dessas culturas. As medidas devem objetivar o controle de *C. occidentalis*, principalmente quando seja utilizada a colheita mecânica em lavouras de milho e sorgo, porque esse método pode favorecer a contaminação dos grãos por sementes da planta, especialmente do sorgo, devido à semelhança em tamanho e peso das sementes, tornando-se difícil a identificação e separação das mesmas (Colvin et al. 1986).

*Agradecimentos.* - Os autores agradecem à Dra Sônia T. Lopes pela realização dos testes enzimáticos e aos Drs Luis Mario Lima Castilhos e Celso Pilati pela ajuda na condução do experimento.

## REFERÊNCIAS

- Barros C.L.S., Pilati C., Andujar M.B., Graça D.L., Irigoyen, L.F., Lopes T.S. & Santos C.F. 1990. Intoxicação espontânea e experimental por *Cassia occidentalis* (Leg. Caes.) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 10(3/4):47-58.
- Brocq-Rousseau & Bruère, P. 1925. Accidents mortels sur des cheveaux dus a la graine de *Cassia occidentalis* L. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 92:555-557.
- Capen C.C. 1985. The endocrine glands, p. 237-303. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed.) *Pathology of Domestic Animals*, Vol. 3, 3rd ed, Academic Press, Orlando.
- 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. *Rep. 2318, Tex. Agric. Exp. Stat. Prog. College Station, Texas A. & M. University Press*, 3p.
- Dollahite J.W. & Henson J.B. 1965. Toxic plants as the etiologic agent of myopathies in animals. *Am. J. Vet. Res.* 26:749-752.
- Doxey, D.L. 1985. *Patologia Clínica e Métodos de Diagnóstico*, 2ª ed. Interamericana, Rio de Janeiro, 306p.
- Duncan J.R. & Prasse K.W. 1982. *Patologia Clínica Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 217p.

- El Sayed N.Y., Abdelbari E.M., Mahmoud O.M. & Adam S.E.I. 1983. The toxicity of *Cassia senna* 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. & Rao, 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. J. Vet. Res.* 44:1370-1374.
- 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.
- Lorenzi H. 1982. *Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais*. Nova Odessa, São Paulo. 425p.
- 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.
- Mercer H.D., Neal F.C., Himes J.A. & Edds, G.T. 1967. *Cassia occidentalis* toxicosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 151:735-741.
- Moussu R. 1925. L'intoxication par les graines de *Cassia occidentalis* L. est due a une toxalbumine. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 92:862-863.
- 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.* 31:2151-2516.
- O'Hara P.J. & Pierce K.R. 1974a. A toxic cardiomyopathy caused by *Cassia occidentalis*. II. Biochemical studies in poisoned rabbits. *Vet. Pathol.* 11:110-124.
- O'Hara P.J. & Pierce K.R. 1974b. A toxic cardiomyopathy caused by *Cassia occidentalis*. II. Biochemical studies in poisoned rabbits. *Vet. Pathol.* 11:110-124.
- Pierce K.R. & O'Hara P.J. 1967. Toxic myopathy in Texas cattle. *Southwestern Vet.* 20:179-184.
- Read W.K., Pierce K.R. & O'Hara P.J. 1968. Ultrastructural lesions of an acute toxic cardiomyopathy of cattle. *Lab. Invest.* 18:227-231.
- Rogers R.J., Gibson J. & Reichmann K.G. 1979. The toxicity of *Cassia occidentalis* for cattle. *Aust. Vet. J.* 55:408-412.
- Rowe L.D., Corrier D.E., Reagor J.C. & Jones L.P. 1987. Experimentally induced *Cassia roemeriana* poisoning in cattle and goats. *Am. J. Vet. Res.* 48:992-997.
- Schmitz D.G. & Denton J.H. 1977. Senna bean toxicity in cattle. *Southwestern Vet.* 30:165-170.
- Simpson C.F., Damron 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.
- 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.