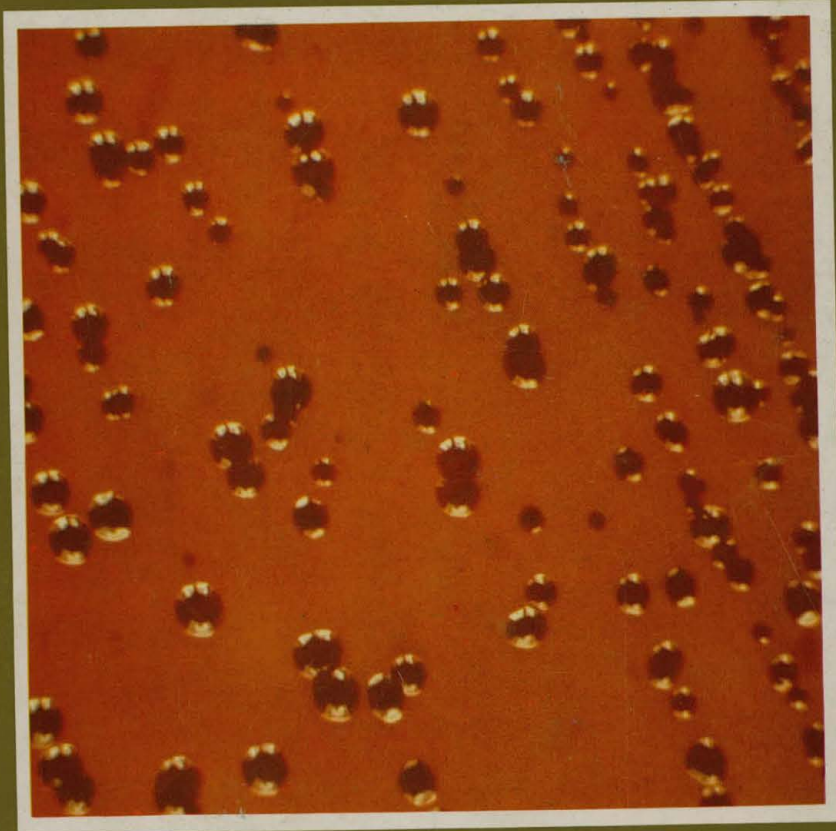


PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Brazilian Journal of Veterinary Research



Revista do Colégio Brasileiro de Patologia Animal

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, é revista bilingüe trimestral editada pelo Colégio Brasileiro de Patologia Animal e publica trabalhos originais de pesquisa no campo da patologia animal no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica. Como complemento traz resumos de trabalhos de ciências veterinárias publicados recentemente no Brasil. 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 investigations. The editors assume that papers submitted are not being considered for publication in other journals and do not contain material which has already been published.

Corpo Editorial (Editorial Board)

Editor: Jürgen Döbereiner. **Editores Assistentes:** Oswaldo Duarte Gonçalves, Cheryl Ann Rowe, José Elyseu Moutinho, Isaias A. de Oliveira. **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, Laert 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-UAPNPSA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851 (Brazil); tel. (021) 782-1081 e 782-1082.

**Este número é publicado e distribuído com o apoio do CNPq-Finep,
da Embrapa e UFRRJ.**

Figura da Capa: Colônias pigmentadas de *Bacteroides* isoladas de lesões peridentárias de bezerro com "cara inchada", em meio de cultura CDC após cultivo em anaerobiose durante 7 dias a 37°C. (Dutra et al., p. 59)

Cover illustration: Colonies of pigmented Bacteroides isolated from periodontal lesions of a calf with "cara inchada", in CDC culture medium after anaerobic incubation during 7 days at 37°C. (Dutra et al., p. 59)

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 6

Abril/Junho 1986

Número 2

SUMÁRIO

Intoxicação por <i>Cassia occidentalis</i> (Leguminosae) em suínos. <i>E. Martins, V.M.V. Martins, F. Riet-Correa, R.A. Soncini & S.V. Paraboni</i>	35-38
Comparação entre os testes de soroneutralização e imunodifusão na detecção de anticorpos para o vírus da doença de Aujeszky em suínos. <i>C.H. Romero, C.A. Rowe, R.S. Flores, L. Brentano & J.L. Marques</i>	39-44
Mieloencefalite equina por protozoário. <i>C.S.L. Barros, S.S. Barros, M.N. Santos, C.A.M. Silva & F. Waihrich</i>	45-49
Intoxicação experimental por <i>Mascagnia pubiflora</i> (Malpighiaceae) em coelhos. <i>J. Döbereiner, A. Gava, L.B. Consorte & C.H. Tokarnia</i>	51-57
Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. <i>I.S. Dutra, M. Kanoe & H. Blobel</i>	59-63
Resumos 12-25	65-66

CONTENTS

Intoxication by <i>Cassia occidentalis</i> (Leguminosae) in swine. <i>E. Martins, V.M.V. Martins, F. Riet-Correa, R.A. Soncini & S.V. Paraboni</i>	35-38
Comparison between the serum neutralization and the immunodiffusion tests for the detection of antibodies for Aujeszky's disease virus in swine. <i>C.H. Romero, C.A. Rowe, R.S. Flores, L. Brentano & J.L. Marques</i>	39-44
Equine protozoal myeloencephalitis. <i>C.S.L. Barros, S.S. Barros, M.N. Santos, C.A.M. Silva & F. Waihrich</i>	45-49
Experimental poisoning by <i>Mascagnia pubiflora</i> (Malpighiaceae) in rabbits. <i>J. Döbereiner, A. Gava, L.B. Consorte & C.H. Tokarnia</i>	51-57
Enzymatic and endotoxic activities of bacteria isolated from periodontal lesions of calves with "Cara inchada". <i>I.S. Dutra, M. Kanoe & H. Blobel</i>	59-63
Abstract of current Brazilian veterinary science literature (in Portuguese).	65-66

ISSN 0100-736X

Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro, v.6 n.2, p.35-66, abr./jun. 1986

XX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Cuiabá, 14-19.7.1986

(Secretaria Executiva: Presidente Dr. Carlos Alberto da Costa Andrade, Rua 13 junho 1060,
CODEAGRI, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT 78000)

14º Congresso Mundial de Buiatria, Dublin, Irlanda, 26-30.8.1986

(Inf.: Dr. H.J. Greene, XIV World Congress on Diseases of Cattle, 44 Northynberland Road,
Dublin 4, Irlanda)

IV Conferência Internacional da Cabra, Brasília, 8-13.3.1987

(Inf.: Dr. Odon P. Santana, Embrapa/DPP, Supercenter Venâncio 2000, 7º and., s. 725, Brasília, DF 70333)

XXIII Congresso Mundial de Veterinária, Montreal, Quebec, Canadá, 16-21.8.1987

(Secretariado: XXIII Veterinary World Congress, 3450, rue University, Montreal, Quebec, Canadá H3A 2A7)

REVISTAS INCLUÍDAS NA PREPARAÇÃO DE RESUMOS
PARA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

- Anais da Escola de Agronomia e Veterinária, Universidade Federal de Goiás
Anais Esc. Agron. Vet. UFGO, Goiânia
- Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.
- Arquivos de Biologia e Tecnologia
Arqs Biol. Tecnol., Curitiba
- Arquivos da Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia
Arqs Esc. Med. Vet. UFBA, Salvador
- Arquivos da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Arqs Fac. Vet. UFRS, Porto Alegre
- Arquivos do Instituto Biológico
Arqs Inst. Biológico, S. Paulo
- Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Arqs Univ. Fed. Rur. Rio de J.
- O Biológico
Biológico, S. Paulo
- Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"
Bolm Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre
- Pesquisa Agropecuária Brasileira
Pesq. Agropec. Bras.
- Revista Brasileira de Medicina Veterinária
Revta Bras. Med. Vet.
- Revista Brasileira de Reprodução Animal
Revta Bras. Reprod. Animal
- Revista do Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria
Revta Centro Cienc. Rurais UFSM, Sta Maria
- Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo
Revta Fac. Med. Vet. Zootec. USP, S. Paulo
- Revista da Faculdade de Veterinária da UFF, Universidade Federal Fluminense
Revta Fac. Vet. UFF, Niterói
- Revista de Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense
Revta Fac. Vet. UFF, Niterói
- Revista de Microbiologia
Revta Microbiol., S. Paulo
- Revista de Saúde Pública
Revta Saúde Públ., S. Paulo

RESUMOS

Pesquisa Veterinária Brasileira traz, em cada número, resumos de trabalhos de ciências veterinárias recentemente publicados em outras revistas brasileiras.

(The journal publishes related abstracts of current Brazilian veterinary science literature.)

DOENÇAS INFECCIOSAS

12. Modena C.M. 1984. **Leucose Enzoótica Bovina. I. Comparação entre as técnicas de diagnóstico de imunodifusão em gel de ágar e chave linfocitária de Bendixen.** [Enzootic Bovine Leukosis. I. Comparison between the gel immunodiffusion test and the lymphatic key of Bendixen.] *Arqs Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 12: 99-107.* Depto Med. Vet. Preventiva, Esc. Vet., Univ. Fed. Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 30000.
- Com o objetivo de avaliar-se a sensibilidade e especificidade da chave linfocitária de Bendixen comparada à da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) com antígeno glicoprotéico, estudaram-se 230 bovinos holandês preto e branco com diferentes faixas etárias. Ao analisar-se a IDGA com a chave de Bendixen, observou-se que o número de falsos negativos eram 48, os de falsos positivos 11 e os de suspeitos 35. Quando se observaram os resultados da IDGA comparados à chave linfocitária, excluindo-se as categorias de suspeitos, falsos negativos e falsos positivos, observou-se que, em 230 diagnosticados à técnica sorológica, somente 136 o foram à chave de Bendixen. Conclui-se que o método hematológico possui sensibilidade e especificidade inferiores ao sorológico, não sendo adequado a programas de controle e/ou erradicação, em nossas condições.
13. Modena C.M. 1984. **Leucose Enzoótica Bovina. II. Comparação entre as técnicas de diagnóstico de imunodifusão em gel de ágar e chave linfocitária da Comunidade Econômica Européia.** [Enzootic Bovine Leukosis. II. Comparison between the gel immuno-diffusion test and the lymphatic key established by the ECC.] *Arqs Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 12:109-119.* Depto Med. Vet. Preventiva, Esc. Vet., Univ. Fed. Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 30000.
- Com o objetivo de avaliar-se a sensibilidade e especificidade da chave linfocitária da Comunidade Econômica Européia, comparada à imunodifusão em gel de ágar com antígeno glicoprotéico, estudaram-se 230 bovinos da raça holandês preto e branco, com diferentes faixas etárias. Conclui-se que o método hematológico possui sensibilidade e especificidade inferiores ao método sorológico, não sendo adequado a programas de controle e/ou erradicação em nossas condições.
14. Modena C.M. 1984. **Leucose Enzoótica Bovina: evolução sorológica através da intervenção em um componente do ciclo de transmissão.** [Enzootic Bovine Leukosis: serologic study through interference in one component of the transmission cycle.] *Arqs Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 12:121-126.* Depto Med. Vet. Preventiva, Esc. Vet., Univ. Fed. Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 30000.
- Com o objetivo de avaliar-se o comportamento epidemiológico da leucose enzoótica bovina, através da intervenção em um componente na cadeia de transmissão horizontal da enfermidade, estudou-se um rebanho leiteiro preto e branco, com sorologia positiva, empregando a técnica de imunodifusão em gel de ágar com antígeno glicoprotéico. Conclui-se que, usando-se somente a esterilização de agulhas e desinfecção do material cirúrgico, a frequência de anticorpos apresentou tendência crescente no período de um ano, após quatro testes intervalados de três meses, de 65,22%; 66,52%; 68,69% e 70,86%.
15. Santos J.L., Ribeiro M.F.B., Faria J.E. & Salcedo J.H.P. 1985. **Epidemiologia da Leucose Enzoótica Bovina no Estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos na Zona da Mata.** [Epidemiology of Enzootic Bovine Leukosis in the State of Minas Gerais. I. prevalence of antibodies in the "Zona da Mata".] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 37(4): 359-368.* Depto Veterinária, Univ. Fed. Viçosa, Viçosa, MG 36570.
- Com o objetivo de determinar a prevalência de anticorpos antivírus da Leucose Enzoótica Bovina na região da Zona da Mata, Estado de Minas Gerais, foram examinados 317 soros, pelo teste de precipitação em gel de ágar. Nas sete microrregiões estudadas, a prevalência variou de 11,76% a 52,38%, sendo que a média foi de 28,39%.
16. Godoy A.M., Peres J.N., Barg L. & Costa J.O. 1985. **Ixodidae como reservatório de brucelose animal.** [Ixodidae as reservoirs of animal Brucellosis.] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 37(4): 369-375.* Depto Microbiologia, Int. Ciênc. Biológicas, Univ. Fed. Minas Gerais, C.P. 2486, Belo Horizonte, MG 30000.
- Os autores investigaram o papel de artrópodos hematófagos, principalmente *Boophilus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyoma cajennense*, como reservatórios da brucelose animal, através de tentativas de isolamento direto em meios de cultura e de inoculação dos macerados desses artrópodos em cobaias. Foram testados 1856 Ixodídeos, obtendo-se, de alguns deles, isolamento de duas amostras de *Brucella abortus* (de *Boophilus microplus*, obtidos de bovinos positivos, com títulos aglutinantes que variavam de 1:100 a 1:800). De ovos de um dos lotes desses carrapatos obteve-se o isolamento de outra amostra de *B. abortus*. As três amostras de *B. abortus* foram isoladas por semeadura em meios de ágar batata e ágar tripticase soja, de material coletado de secções transversais de Ixodídeos e macerados dos mesmos e dos ovos.
17. Nadar Filho A., Schocken-Iturrino R.P., Rossi Junior O.D. & Amaral L.A. 1985. **Methods for detections of subclinical mastitis: A comparative study.** [Estudo comparativo de métodos para detecção de mastite subclínica.] *Ars Veterinária, Jaboticabal, 1(1): 129-135.* Depto Higiene Veterinária e Saúde Pública, Fac. Ciênc. Agrárias e Veterinárias, Rod. Carlos Tonanni, Km 5, Jaboticabal, SP 14870.
- A comparative study was made using California Mastitis Test (CMT) direct microscopic somatic cell counting (DMSCC), chloride content (CC) and bacteriological examination (BE), in 468 cows that produce milk type B, in the Municipium of Barretos/SP, with the aim of ascertaining the agreement between these methods that are used in the diagnosis of subclinical mastitis in cows. The DMSCC presented the large concordance (87.5%) with the BE, followed by the CMT (85.7%) and CC (50.0%). As the simplest test giving rapid and reliable results in the field, the CMT is recommended. Bacteriological isolation and identification tests found *Staphylococcus aureus* in 44.6% of the cases and varieties of *Streptococcus* in 33.9%.
18. Kotait I., Queiroz L.H. & Souza M.C.A.M. 1985. **Constatação da doença de Aujeszky em um felino (*Felis catus*) no Estado de Mato Grosso.** [Aujeszky's disease in a cat (*Felis catus*) in Mato Grosso.] *Biológico, S. Paulo, 51(3): 79-81.* Seção de Raiva e Encefalomielite, Inst. Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves 1252, C.P. 4185, São Paulo, SP 04014.
- É feito o primeiro relato de um caso espontâneo da doença de

Aujesky em gato doméstico no Brasil. Na fazenda havia criação de suínos e bovinos, e foi observada a presença de camundongos silvestres na propriedade. O diagnóstico foi estabelecido através de teste de imunofluorescência e inoculação em camundongos, coelhos e culturas celulares (células VERO).

DOENÇAS PARASITÁRIAS

19. Brum J.G.W., Gonzales J.C. & Petruzzi M.A. 1985. **Postura e eclosão de *Boophilus microplus* (Can., 1887) em diferentes localizações geográficas do Rio Grande do Sul, Brasil.** [Oviposition and hatch of *Boophilus microplus* (Can., 1887) located at different geographical sites in the State of Rio Grande do Sul (Brazil).] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootéc.*, 37(6): 581-587. Depto Microbiologia e Parasitologia, Inst. Biologia, Univ. Fed. Pelotas, C.P. 354, Pelotas, RS 96100.

Observou-se o comportamento de teleóginas de *Boophilus microplus* (Can., 1887), sob condições de meio ambiente, em Pelotas e Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul, Brasil. Mensalmente, eram levados àqueles locais dois grupos de 5 gramas de teleóginas e colocadas em placas de Petri no meio ambiente, protegidas do sol e precipitações atmosféricas. Em Pelotas houve postura em todos os meses do ano, mas em quatro deles não houve eclosão; em Santa Vitória do Palmar não aconteceu postura em dois meses e em cinco houve postura sem eclosão. Em Pelotas são possíveis duas a três gerações por ano, sugerindo ser uma região marginal para o desenvolvimento do carrapato; em Santa Vitória do Palmar foi viável apenas uma geração por ano, permitindo admitir-se seja o *B. microplus* incapaz de sobreviver naquela região.

20. Chaplin E.L., Silva N.R.S., Sebben J.C., Araújo F.A.P. & Mendez L.D.V. 1984. **Cadeia epidemiológica da toxoplasmose em Guaporé, RS, relacionando humanos e seus animais domésticos.** [Epidemiology chain of toxoplasmosis in Guaporé, RS, Brazil, related to man and its domestic animals.] *Arqs Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 12: 25-34.* Depto Med. Vet. Preventiva, Fac. Vet., Univ. Fed. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90000.

A avaliação epidemiológica de reagentes a *Toxoplasma gondii* em Guaporé, RS, determinou: que humanos (66,7%), felinos (40,7%) e caninos (21,0%) são mais prevalentes que suínos (7,4%) e bovinos (5,4%); que vários indivíduos da mesma família apresentavam-se reagentes; a importância do felino na disseminação do *Toxoplasma gondii* ao homem e aos demais animais domésticos da região. A técnica utilizada foi a reação de hemaglutinação indireta considerando-se como título positivo valores a partir de 1:64.

21. Araújo F.A.P., Silva N.R.S., Chaplin E.L. & Santos E.B. 1984. **Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em soros de caprinos da região da Grande Porto Alegre, RS.** [Prevalence of Toxoplasma antibodies in caprine serum in Porto Alegre area, RS.] *Arqs Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 12: 35-40.* Depto Med. Vet. Preventiva, Fac. Vet., Univ. Fed. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90000.

Foram colhidas 118 amostras de soros de caprinos da região da Grande Porto Alegre, RS. O método sorológico utilizado foi o da hemaglutinação indireta (HAI), apresentando 16,1% de soros positivos, com a seguinte distribuição: 102,2% com título 1:64; 2,5% com 1:256; 2,5% com 1:1.024; e 0,9% com 1:4.096.

22. Kessler R.H., Araújo F.A.P., Silva N.R.S. & Chaplin E.L. 1984. **Prevalência de *Babesia bovis* através de esfregaço cerebral de bovinos provenientes das 11 regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul.** [Prevalence of *Babesia bovis* using the brain smear technique in clinically normal bovines of the state of Rio Grande do Sul, Brazil.] *Arqs Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 12: 41-46.* Depto Med. Vet.

Preventiva, Fac. Vet., Univ. Fed. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90000.

A prevalência de *Babesia bovis*, em esfregaços de cérebros de bovinos clinicamente sadios, provenientes das 11 regiões do Estado do Rio Grande do Sul, foi de 36,3%. A distribuição nas regiões foi de 90% Alto Uruguai, 60% Planalto Médio, 51% Campos de Cima da Serra, 54% Encosta Superior do Nordeste, 20% na Encosta Inferior do Nordeste, 18% Depressão Central, 34% Litoral, 34% Serra do Sudeste, 40% Campanha, 8% Missões. A utilização do esfregaço de cérebro para diagnóstico da doença deve ser criteriosa. O mapeamento de prevalência de *Babesia bovis*, no estado é importante para a mobilização de animais nas diferentes regiões do Estado.

PATOLOGIA, CLÍNICA E CIRURGIA

23. Fonseca M.M.M. & Zolin I.S. 1984. **Resíduos de antibióticos em leite – Porto Alegre, RS.** [Residues of antibiotics in the milk of Porto Alegre, RS, Brazil.] *Arqs Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 12: 47-50.* Depto Med. Vet. Preventiva, Fac. Vet., Univ. Fed. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90000.

A presença de resíduos de antibióticos foi avaliada pela técnica de inibição do crescimento do *B. stearrowthermophilus*, variedade calidolactis. No presente experimento foram examinadas 1.045 amostras; destas, 11,68% deram resultados positivos.

24. Rosa L.C.A., Siqueira M.M., Andrade P., Oliveira M.D.S. & Sampaio A.A.M. 1985. **Efeito do selênio e vitamina "E" sobre a retenção da placenta do gado leiteiro.** [Effect of selenium and vitamin E on retention of placenta in dairy cows.] *Ars Veterinária, Jaboticabal, 1(1): 117-122.* Depto Melhoramento e Nutrição Animal, Fac. Ciências Agrárias e Veterinárias, Rod. Carlos Toanni, Km 5, Jaboticabal, SP 14870.

Foram realizados três experimentos, na região de Descalvado – (SP), com o objetivo de determinar o possível efeito do selênio, associado ou não à vitamina "E", na prevenção da retenção de placenta, em vacas da raça holandesa. O experimento I se constituiu de 23 animais, com um nível de selênio de 50 mg e 680 UI de vitamina "E". Do experimento II participaram 53 animais, que receberam 70 mg de selênio e 680 UI de vitamina "E". O experimento III foi realizado com 31 animais, com um nível de selênio de 50 mg e sem vitamina "E". Todas as aplicações foram realizadas 20-30 dias pré-parto, e os dados foram analisados pelo teste Quiquadrado, não se observando diferenças significativas entre os tratamentos, o que nos leva a crer na não eficiência da utilização do selênio e vitamina "E" na prevenção da retenção de placenta, nas condições do presente experimento.

25. Oliveira Filho B.D. & Megale F. 1983. **Calcificação testicular em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Goiás.** [Testicular calcification in bulls slaughtered in the State of Goiás, Brazil.] *Revta Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, 7(3): 11-20.* Esc. Vet., Univ. Fed. Goiás, Goiânia, GO 74000.

Descrevem-se os aspectos anatomo-histopatológicos e a frequência de testículos com calcificação em reprodutores bovinos em frigoríficos no Estado de Goiás. Em 304 animais estudados, 46 (15,13%) apresentaram calcificação testicular, sendo a lesão bilateral em 32 (69,56%) e unilateral em 14 (30,43%). A idade dos animais afetados pela lesão variou de cinco a 15 anos, com frequência maior entre seis e nove. Todos os casos estavam acompanhados de depenação do epitélio seminífero, não havendo diferença do comprimento, espessura, largura, volume e peso entre os testículos lesados e normais.

PROCEDIMENTOS PRÁTICOS PARA SANAR REBANHOS COM ALTOS ÍNDICES DE MASTITE

1. Introdução

Partindo-se do princípio de que cada quarto de úbere reduz sua produção em cerca de 20% quando for portador de mastite subclínica crônica e que índices de infecções próximos a 50% ou mais provocam alterações tão acentuadas da composição do leite que motivam a rejeição do produto nas usinas de beneficiamento, torna-se evidente e prioritário o saneamento do rebanho, quanto antes, para recuperar a produtividade do mesmo.

O saneamento de rebanhos com altos índices de mastite subclínica requer, inicialmente, uma anamnese (histórico) sobre o manejo do rebanho com ênfase sobre as medidas preventivas que vinham sendo adotadas para o controle da mastite em cada estabelecimento. É imprescindível uma visita ao estábulo para analisar e reconhecer as prováveis causas que motivaram a propagação da infecção do úbere naquele rebanho a ser sanado.

Se for constatada a falta de conhecimentos básicos sobre as medidas preventivas gerais contra a mastite por parte dos empregados, torna-se imperioso concientizar proprietário, capataz e ordenhadores, antes e durante o saneamento do rebanho, sobre as medidas higiênicas, sanitárias e de manejo que devem ser adotadas como rotina de trabalho no estábulo, visando a prevenção da mastite.

2. Diagnóstico da mastite no rebanho

O saneamento de um rebanho requer o diagnóstico da mastite com reconhecimento do número de vacas e quartos infectados, a natureza dos agentes causais e a sensibilidade dos microrganismos responsáveis pela infecção aos antimicrobianos disponíveis no comércio. Para isto recomenda-se os seguintes procedimentos:

a) *Teste de mastite da Califórnia (CMT)*. O uso desta prova ao pé da vaca permite obter, no estábulo, orientação sobre a situação da mastite subclínica no rebanho. Devem ser examinadas todas as vacas em lactação, individualmente, quarto por quarto, com o cuidado de registrar, em protocolo próprio, os resultados do escores (+, ++, +++). Na identificação das vacas, fazer ressalva às que estão no período de colostro ou no final da lactação, pois no leite destas ocorrem falsas reações positivas na prova do CMT.

b) *Exame bacteriológico*. O isolamento e a identificação dos agentes etiológicos da mastite é importante para orientar o combate. O exame bacteriológico é muito facilitado se a amostra de leite for coletada com a maior assepsia possível. Convém colher amostras de leite em cerca de 10% dos quartos reagentes no CMT com altos escores. Com prévia incubação do leite por 12 a 18 horas e depois semeadura em placas de agar sangue reconhece-se os microrganismos prevalentes no rebanho.

c) *Antibiograma*. Diante das multiresistências, já frequentemente observadas, dos microrganismos causadores da mastite aos antimicrobianos, torna-se imperioso testar a sensibilidade para que o tratamento seja racional. Recomenda-se fazer o antibiograma com as culturas isoladas no procedimento anterior e testar os antibióticos e quimioterápicos contidos nos medicamentos disponíveis na praça para reduzir o custo do tratamento.

3. Tratamento terapêutico

O saneamento de rebanhos com altos índices de mastite subclínica depende de uma medicação eficaz, baseada no antibiograma.

O tratamento se torna racional se forem medicadas apenas os quartos infectados, indicados pelo CMT e utilizados produtos bons com preço módico. A aplicação do medicamento deverá ser por via intracisternal, após o esgotamento da ordenha da tarde, tendo-se o cuidado de desinfetar bem a abertura do canal da teta com solução de álcool-iodado. Após a infusão, é necessário deslocar o medicamento para a cisterna do úbere e auxiliar a dispersão do mesmo pelos canais galactóforos por massagem do quarto medicado.

Pode ser adotado um dos seguintes sistemas alternativos de tratamento terapêutico da mastite subclínica:

a) *Uma única aplicação do medicamento*. Esta permite curar cerca de 60% das infecções causadas por *Staphylococcus sp.* e 70% das de *Streptococcus sp.* Aos 30 e aos 60 dias após repete-se o exame controlando-se o resultado pelo CMT e os quartos reagentes são novamente medicados. Com este procedimento consegue-se reduzir a infecção a cerca de 5% dos quartos e assim os gastos com o medicamento se diluem durante 3 meses.

b) *Três aplicações em dias consecutivos*. Neste esquema aplica-se o medicamento nos quartos infectados durante três dias seguidos, após a ordenha da tarde. Com esta prática reduz-se rapidamente o índice de mastite a cerca de 5% dos quartos, mas o custo é muito maior, comparado com o esquema anterior. Uma aplicação elimina a infecção em 60 a 70% dos quartos tratados, mas para saber quais os quartos não curados é necessário fazer novo exame pelo CMT 12 a 14 dias após. Para evitar novos exames faz-se a medicação concentrada gastando quase o triplo com medicamentos.

c) *Tratamento da mastite durante o período "seco"*. Esta prática é menos indicada para sanar rebanhos altamente infectados porque o efeito do tratamento se faz a longo prazo e, enquanto isto, persistem os prejuízos causados pela mastite. O sucesso deste esquema está também mais dependente da adoção e observância das medidas preventivas gerais, pois há maior oportunidade de reinfecção, após o parto, na entrada da nova lactação, quando a vaca volta ao estábulo e permanece com outras ainda portadoras de mastite subclínica.

4. Considerações complementares

No saneamento de um rebanho, a identificação dos agentes etiológicos é muito importante, não só por causa da avaliação da sensibilidade contra os antimicrobianos disponíveis, mas também para orientar a estratégia do combate de mastite. Uma alta prevalência de mastites subclínicas causadas por *Staphylococcus sp.* mostra ao sanitarista a necessidade de corrigir principalmente as medidas higiênicas. É também uma alerta de que a resposta terapêutica será menos eficiente e porque frequentemente os estafilococos invadem o tecido mamário formando micro-abscessos, ao passo que nas infecções por estreptococos a medicação é mais eficaz porque estes se colonizam sobre a mucosa dos canais galactóforos e assim são alvos mais fáceis da ação dos medicamentos.

O sanitarista também deve estar ciente de que o saneamento de rebanhos grandes é mais difícil do que rebanhos

pequenos, porque naqueles há maior concentração de animais e portanto maior exposição a reinfecções. As medidas profiláticas, em face do grande número de indivíduos a serem atendidos, tendem a ser menos rigorosas.

O saneamento de um rebanho altamente infectado é muito facilitado se as vacas portadoras de mastites crônicas e que não respondem ao tratamento, são afastadas do rebanho, porque estas se constituem em fontes contínuas para novas infecções do úbere.

O êxito no saneamento da mastite com os procedimentos acima descritos é tanto mais garantido quanto melhor forem adotadas e observadas, paralelamente, as medidas preventivas descritas na revista Pesquisa Veterinária Brasileira 6(1), vii, 1986, em Tópico de Interesse Geral.

JEROME LANGENEGGER

Embrapa-UAPNPSA, Km 47
23851 Seropédica, RJ

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, 23460 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 a 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 tra-

balho 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 distinguirem 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 colocadas 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 agrupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando 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.

INTOXICAÇÃO POR *Cassia occidentalis* (Leguminosae) EM SUÍNOS¹

EDISON MARTINS², VERA M. V. MARTINS³, FRANKLIN RIET-CORREA⁴,
RICARDO A. SONCINI⁵ e SERGIO V. PARABONI⁶

ABSTRACT.- Martins E., Martins V.M.V., Riet-Correa F., Soncini R.A. & Paraboni S.V. 1986. [Intoxication by *Cassia occidentalis* (Leguminosae) in swine.] Intoxicação por *Cassia occidentalis* (Leguminosae) em suínos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 6(2): 35-38. Centro Nac. Pesq. Suínos e Aves, Embrapa, BR 153, Km 110, Concórdia, SC 89700, Brazil.

Two outbreaks of intoxication by *Cassia occidentalis* in pigs occurred on a farm located in the municipality of Águas de Chapecó, Santa Catarina, Brazil. The ingestion occurred after corn mixed with *C. occidentalis* seeds, harvested on a plantation with large amounts of the plant in the fruiting stage, was introduced into the diet. In July, 1983, from a total of 1200 pigs, 460 were affected and 420 died as a consequence of the disease. In June, 1984, of 800 animals, 40 were affected and 38 died. Clinical signs were characterized by anorexia, apathy, ataxia, diarrhea, vomiting, dyspnea, and lateral recumbency, with death occurring between eight and twelve days after ingestion was initiated. Postmortem examination of skeletal and cardiac muscles showed areas of paleness together with normal areas; the liver was pale and enlarged. Histological examination showed degeneration of skeletal and cardiac muscles and vacuolization of hepatocytes. The disease was experimentally reproduced in four swine, three ingesting seeds of *C. occidentalis* comprising 20% of the ration, and one that ingested ration containing 10% seeds. The four animals died seven to eight days after the start of the experiment. Clinical signs and pathological alterations were similar to those observed in field cases.

INDEX TERMS: Swine, plant intoxication, *Cassia occidentalis*, Leguminosae, muscle degeneration.

SINOPSE.- Descrevem-se 2 surtos de intoxicação por sementes de *Cassia occidentalis* em suínos, em uma granja localizada no município de Águas de Chapecó, Santa Catarina. A ingestão ocorreu após ser introduzido na alimentação das animais, milho misturado com sementes de *C. occidentalis*, colhido em uma lavoura com grandes quantidades da planta em estágio de frutificação. Em julho de 1983 adoeceram 460 suínos e morreram 420 de um total de 1200 e, em junho de 1984 adoeceram 40 e morreram 38 de um total de 800. Os sinais clínicos, observados 3 dias após o início da ingestão caracterizaram-se por anorexia, apatia, ataxia, diarreia, vômitos, urina amarelo escura, dispnéia, decúbito lateral e morte 8 a 12 dias após o início da ingestão. As principais lesões macroscópicas caracterizaram-se por áreas de palidez intercaladas com áreas de coloração normal nos músculos esqueléticos e cardíaco, e fígado aumentado de tamanho e com coloração mais clara que a normal. Histologicamente observou-se degeneração dos músculos esqueléticos e cardíaco e vacuolização dos hepatócitos. A doença foi repro-

duzida experimentalmente em 4 suínos, 3 que ingeriram sementes de *C. occidentalis* misturadas a 20% com a ração e 1 que ingeriu as sementes a 10%. Os 4 animais morreram 7 a 8 dias após o início da administração. Os sinais clínicos e patologia observados foram similares à dos casos espontâneos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Suínos, intoxicação por planta, *Cassia occidentalis*, Leguminosae, degeneração muscular.

INTRODUÇÃO

A intoxicação por *Cassia occidentalis* ocorre espontaneamente em eqüinos (Brocq-Rousseau & Bruere 1925, Moussu 1925) e bovinos (Schmitz & Denton 1977, Henson et al. 1965, Pierce e O'Hara 1967), sendo nesta espécie caracterizada clinicamente por mioglobulinúria, incoordenação, decúbito e morte, apresentando lesões macroscópicas e histológicas de degeneração dos músculos estriados. A enfermidade tem sido reproduzida experimentalmente em bovinos (Dollahite & Henson 1965, Henson & Dollahite 1966, Mercer et al. 1967, Read et al. 1968, O'Hara et al. 1969, 1970, Rogers et al. 1979), coelhos (Dollahite & Henson 1965, O'Hara & Pierce 1974), aves (Simpson et al. 1971, Graziano et al. 1983, Hebert et al. 1983), caprinos e ovinos (Dollahite & Henson 1965).

No Brasil, Torres et al. (1971) estudaram o efeito de *Cassia occidentalis* administrada experimentalmente a galinhas poedeiras, verificando uma diminuição significativa da postura nas aves tratadas.

1 Aceito para publicação em 2 de janeiro de 1986.

2 ACARESC, Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA), BR 153, Km 110, Concórdia, Santa Catarina 89700.

3 Bolsista da Embrapa, CNPSA.

4 Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96100.

5 Embrapa-CNPISA.

6 CIDASC, Associação Catarinense de Criadores de Suínos, R. Neure Ramos s/nº, Chapecó, SC 89750.

O objetivo do presente trabalho foi descrever dois surtos de intoxicação por *C. occidentalis* ("fedegoso") em suínos, assim como demonstrar experimentalmente a toxicidade das sementes da planta nessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados clínicos e epidemiológicos foram observados em dois surtos que ocorreram nos anos de 1983 e 1984, em uma granja de suínos no município de Águas de Chapecó, Santa Catarina. Para determinar as alterações macroscópicas foram necropsiados dez suínos que morreram após apresentarem manifestações clínicas da doença. Para o estudo das lesões histológicas, fragmentos de músculo cardíaco, bíceps femural, diafragma, masseteres, intercostais, longísimus dorsi, fígado, rim, intestinos delgado e grosso, estômago, pulmão, gânglios linfáticos e sistema nervoso central, de suínos necropsiados nos anos de 1983 e 1984, foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados a 6 micra e corados pela técnica de hematoxilina eosina.

Conforme instruções do Serviço de Defesa Sanitária da Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado de Santa Catarina, amígdalas, baço e fígado de um animal morto foram enviados ao Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA) para diagnóstico de peste suína.

Para a reprodução experimental da intoxicação, foram utilizados, em um primeiro experimento, três suínos, pesando 17,5 kg, 18,3 kg e 14,5 kg, provenientes de uma granja sem história clínica da enfermidade. Sementes maduras de *C. occidentalis* coletadas na lavoura de onde provinha o milho que causou o surto, foram moídas e misturadas a 20% em uma ração de crescimento. Essa concentração foi determinada baseando-se na semelhança das características visuais da ração experimental com as da ração que ocasionou o surto. Os suínos foram colocados em uma mesma baía, recebendo ração a vontade, sendo observados diariamente.

Em um segundo experimento, um suíno, pesando 15 kg, recebeu, em forma similar aos anteriores, sementes de *C. occidentalis* misturadas a 10% na ração.

Após as necropsias dos animais experimentais, o estudo histológico foi realizado nos mesmos órgãos e em forma similar à descrita anteriormente para os casos espontâneos.

Um suíno normal, de idade e peso similar aos utilizados nos experimentos foi sacrificado, coletando-se materiais para serem utilizados como controle.

RESULTADOS

Epidemiologia

O primeiro surto ocorreu em julho de 1983 em uma granja de reprodutores com 1200 suínos, no município de Águas de Chapecó, Estado de Santa Catarina, após ser introduzido, na alimentação dos animais, milho com sementes de *C. occidentalis*⁷, colhida mecanicamente em uma lavoura com grandes quantidades da planta em estágio de frutificação. A doença afetou 460 suínos de todas as faixas etárias, exceto lactentes, causando a morte de 420 animais. Uma enfermidade similar foi observada em seis bovinos adultos que ingeriram a ração destinada aos suínos, dos quais quatro morreram.

O segundo surto ocorreu no mesmo estabelecimento em junho de 1984, após ser introduzido na ração, milho contendo sementes de *C. occidentalis* proveniente da mesma área e colhido da mesma forma que no ano anterior. De uma população

de 800 suínos, adoeceram 40 e morreram 38, sendo afetados animais de todas as faixas etárias, exceto lactentes.

Sintomas e evolução

Casos espontâneos. Nos dois surtos, a partir do 3º dia de ingestão da ração, os suínos apresentaram anorexia e apatia, sendo observado no 4º dia diarreia e vômito. Entre os 6º e 7º observou-se perda do equilíbrio, ataxia, dispnéia, urina amarelo escura, decúbito lateral e morte entre o 8º e 12º dia. Nos bovinos os sintomas observados foram diarreia ao 4º dia, após o início da ingestão, seguida de constipação, anorexia e depressão. Observou-se ataxia entre os 6º e 7º dias, urina vermelho escuro, sendo que 4 morreram ao 8º dia, e os 2 animais que sobreviveram perderam peso e permaneceram com incoordenação muscular.

Casos experimentais. Os suínos que receberam as sementes misturadas a 20% na ração apresentaram anorexia no 3º dia após o início da ingestão, posteriormente observou-se dispnéia, urina amarelo escura, ataxia e decúbito lateral; um dos suínos apresentou diarreia no 3º dia, sendo que no 5º dia as fezes se tornaram mais consistentes; este suíno morreu no 7º dia e os restantes no 8º. O total de ração consumida pelos 3 suínos foi de 12,9 kg.

O suíno que recebeu as sementes misturadas a 10% na ração apresentou os mesmos sintomas e evolução descritos anteriormente, não observando-se diarreia. A morte ocorreu ao 8º dia do experimento tendo ingerido 3,5 kg de ração.

Patologia

Alterações macroscópicas

Casos espontâneos. As principais alterações observadas foram áreas de palidez, intercaladas com áreas de coloração normal nos músculos esqueléticos e cardíaco. O rim e o fígado apresentavam-se com coloração mais clara que a normal, estando o último aumentado de volume. Os intestinos, delgado e grosso, encontravam-se congestos em toda a sua extensão, assim como o mesentério e alguns gânglios mesentéricos. A bexiga apresentava-se muito distendida e repleta com urina de cor amarelo escura, bem como os ureteres. Na região fúndica do estômago observou-se congestão.

Casos experimentais. Observaram-se áreas de palidez nos músculos: cardíaco, diafragma, bíceps femural, masseteres, longísimus dorsi, abdominais e pré-escapular. O rim e fígado apresentavam-se de coloração mais clara que o normal, encontrando-se o último aumentando de volume. A bexiga apresentava-se cheia com urina de coloração amarelo escura. O intestino, mesentério e gânglios mesentéricos apresentavam severa congestão.

Alterações histológicas

Suínos com doença espontânea. Nos músculos esqueléticos, numerosas fibras musculares encontravam-se separadas entre si, sinuosas e de calibre irregular e em algumas áreas apresentavam-se homogeneamente hialinas ou com necrose, caracterizada pela presença de flóculos amorfos no sarcoplasma, separados por espaços que freqüentemente continham um exsudato hialino, e, às vezes macrófagos (Fig. 1). As fibras que apresentavam essas lesões estavam total ou parcialmente fragmentadas.

⁷ A planta foi identificada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

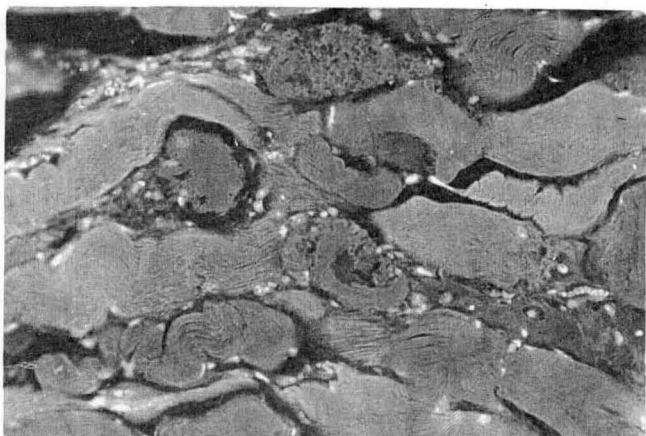


Fig. 1. Músculo esquelético de um suíno que ingeriu espontaneamente sementes de *Cassia occidentalis*. Observam-se fibras musculares aumentadas de tamanho com presença de flóculos amorfos no sarcoplasma, exsudato hialino e infiltração de macrófagos; proliferação de núcleos do sarcolema. HE, obj. 20.

Entre as fibras, e onde essas estavam fragmentadas observava-se edema, proliferação de núcleos do sarcolema e infiltração de células mononucleares. Essas alterações não eram observadas homogeneamente em todas as fibras, alternando-se áreas com diferentes graus de lesão e áreas aparentemente normais. No músculo cardíaco a degeneração foi menos severa do que nos músculos esqueléticos podendo-se observar hialinização do sarcoplasma de algumas fibras, edema perivascular e perineural.

No fígado, muitos hepatócitos estavam aumentados de tamanho, mostrando vacuolização do seu citoplasma e, às vezes, flóculos hialinos citoplasmáticos; em algumas áreas observou-se necrose coagulativa centro-lobular. A nível renal observou-se vacuolização e tumefação do epitélio tubular, bilirrubina no lúmen dos túbulos, retração dos glomérulos e edema perivascular. Na cortex cerebral foram observados edema perivascular e perineural, assim como espongirose da substância cinza.

Suínos experimentais. Os músculos esqueléticos dos 4 suínos, apresentavam lesões similares, porém mais discretas que as dos suínos que morreram espontaneamente. Segmentos de algumas fibras apresentavam-se sinuosas, separadas entre si, aumentadas de calibre e hialinas; áreas de necrose, com presença de flóculos no citoplasma eram raramente encontradas; observava-se uma discreta proliferação de núcleos do sarcolema e células mononucleares.

O fígado dos 3 suínos que receberam a planta a 20% na ração, apresentavam lesões muito severas, afetando todos os hepatócitos, que se apresentavam com numerosos vacúolos no seu citoplasma, o qual em muitas oportunidades, era substituído em grande parte por um espaço claro. Alguns núcleos desses hepatócitos apresentavam-se aumentados de tamanho, com a cromatina localizada na periferia e um espaço claro ao redor do nucléolo. Observou-se congestão dos sinusóides, algumas vezes na área centrolobular e outras em todo o lóbulo. No suíno que recebeu a planta a 10% na alimentação a vacuolização do citoplasma dos hepatócitos era similar à observada nos casos espontâneos, menos severa que os que receberam a

planta a 20%, observando-se alguns hepatócitos com o citoplasma vacuolizado junto a outros aparentemente normais, e presença de glóbulos hialinos no citoplasma.

Os demais tecidos não apresentaram lesões de significação patológica.

Em um suíno com a doença espontânea, necropsiado no ano 1984, através de provas de referência utilizadas pelo LANARA, foi isolado vírus de peste suína clássica.

DISCUSSÃO

A ocorrência de dois surtos de uma doença, em 2 anos consecutivos, após ter sido introduzido na alimentação milho contaminado por sementes de *Cassia occidentalis*, as lesões histológicas caracterizadas por degeneração muscular e vacuolização dos hepatócitos, e a reprodução experimental da enfermidade, confirmam o diagnóstico de intoxicação por essa planta. Esta pareceria ser a primeira vez em que é descrita a intoxicação por *C. occidentalis* em suínos. No surto que ocorreu no ano de 1983 foram realizadas determinações de ocratoxinas por cromatografia em capa fina, encontrando-se os seguintes valores para ocratoxina A e B: milho 634 ppb; ração 435 ppb; fígado 35 ppb; rim 34 ppb (Cruz et al. 1984). Apesar desses resultados, é evidente que a presença dessas toxinas, não é suficiente para estabelecer o diagnóstico de ocratoxicose, já que as lesões musculares e hepáticas, observadas nos casos espontâneos e reproduzidas em animais experimentais mediante a administração de *C. occidentalis*, diferem das descritas na ocratoxicose, que se caracterizam principalmente por nefrose (Krogh 1977).

Uma consideração deve ser realizada no referente ao diagnóstico diferencial da enfermidade, no relacionado ao isolamento de vírus da peste suína clássica das amígdalas de um animal morto espontaneamente durante o ano de 1984; considerando que a epidemiologia, sintomas clínicos e patologia observados, foram totalmente diferentes dos observados na forma típica de peste suína clássica, pareceria evidente que o animal, morto em consequência da intoxicação por *C. occidentalis*, era um portador subclínico do vírus de peste suína, provavelmente um vírus vacinal.

As alterações clínicas, caracterizadas principalmente por debilidade muscular, evidenciadas por transtornos da locomoção, tais como, ataxia e decúbito permanente são similares as observadas em bovinos (Henson et al. 1965, Schmitz & Denton 1977) e aves (Graziano et al. 1983) intoxicadas por *C. occidentalis*. Sintomas digestivos, caracterizados por diarreia e vômitos em nossos suínos, evidentes do 3º ao 7º dia após a ingestão da planta, são também descritos em bovinos, nos quais se observa diarreia nos primeiros estágios da doença, principalmente entre o 2º e 4º dia após a ingestão (O'Hara et al. 1969, Schmitz & Denton 1977, Rogers et al. 1979). A coloração amarelo escura da urina, não observando-se animais com urina de cor avermelhada ou marron escuro em nossos animais, pareceria indicar que a mioglobinúria, que é um sinal clínico frequentemente observado em bovinos intoxicados por *C. occidentalis* (Henson et al. 1966, Schmitz & Denton 1977, Rogers et al. 1979) não ocorre ou é discreta ou pouco freqüente em suínos.

No estudo da patologia, a lesão mais significativa em nossos suínos, com relação ao diagnóstico, foi a degeneração dos músculos esqueléticos, que é uma alteração constante na intoxicação espontânea por *C. occidentalis* em bovinos (Henson et al. 1965, Pierce & O'Hara 1967, Schmitz & Denton 1977). Com relação ao músculo cardíaco, as lesões eram menos severas que as dos músculos esqueléticos. Segundo Pierce e O'Hara (1967) este fato poderia ser devido a que as mesmas ocorrem no período terminal da doença; por outro lado Read et al. (1968) e Graziano et al. (1983) determinaram que as lesões do músculo cardíaco, fracamente observadas na microscopia de luz, são claramente evidenciadas na microscopia eletrônica. Outra lesão importante foi a vacuolização dos hepatócitos, que é também observada em aves (Graziano et al. 1983) e bovinos (Rogers et al. 1979). Nesta última espécie e também em coelhos são descritos outros tipos de lesões degenerativas e necróticas no fígado (Dollahite & Henson 1965, Henson et al. 1965, Henson & Dollahite 1966, O'Hara & Pierce 1974). Apesar de não ter sido definitivamente identificado o princípio ativo da planta (Graziano et al. 1983) foi demonstrado, que sua ação tóxica é devida, primariamente ao seu efeito sobre as mitocôndrias, inibindo a sua função e causando, em consequência, degeneração muscular (Read et al. 1968, O'Hara & Pierce 1974, Graziano et al. 1983) e vacuolização dos hepatócitos (Graziano et al. 1983).

Chama a atenção a diferença no grau das lesões observadas nos suínos mortos espontaneamente, com os que adoeceram experimentalmente, já que nos casos espontâneos as lesões musculares eram marcadas e a vacuolização dos hepatócitos discreta enquanto que, nos casos experimentais, principalmente nos que receberam a planta a 20% na ração, a vacuolização dos hepatócitos era marcada e as lesões musculares discretas. Esse fato poderia ser devido a que a dose ingerida em forma espontânea foi diferente da administrada experimentalmente.

Considerando que a doença causou perdas econômicas importantes no estabelecimento estudado, representadas pela perda de 420 suínos no ano de 1983 e 48 no ano de 1984, é evidente a necessidade de adotar medidas profiláticas que evitem a ocorrência da intoxicação por *C. occidentalis* em suínos ou outras espécies que possam ser alimentadas com rações contaminadas por essa planta. Tais medidas deverão objetivar o controle de *C. occidentalis* como invasora das lavouras de milho, principalmente quando seja utilizada a colheita mecânica. Nos casos em que a plantação esteja invadida pela planta, a colheita mecânica poderá ser substituída pela colheita manual.

Outro fato a ser destacado é a ocorrência de sintomas clínicos e morte em bovinos que foram alimentados com a ração contaminada por *C. occidentalis* no ano de 1983; apesar de não terem sido realizadas necropsias nesses animais, pareceria muito provável, baseado nos dados epidemiológicos e sinais clínicos, que os bovinos morreram em consequência da ingestão da planta e portanto deve ser chamada a atenção para a possível importância de *C. occidentalis* como planta tóxica

para bovinos, isto porque essa espécie pode intoxicar-se espontaneamente, em condições de campo, através do consumo das diversas partes da planta, principalmente após as primeiras geadas (Schmitz & Denton 1977).

REFERÊNCIAS

- Brocq-Rousseau & Bruere P. 1925. Compt. Rend. Soc. Biol. 92: 555. (Citado por Kim et al. 1971)
- Cruz L.C.H., Rosa C.A.R., Campos S.G., Locatelli J.C. & Turatti J.A. 1984. Ocratoxicose em suínos no estado de Santa Catarina. (Resumo apresentado no V Congresso Fluminense de Medicina Veterinária). Revta Bras. Med. Vet. 6(1): 24.
- Dollahite J.W. & Henson J.B. 1965. Toxic plants as the etiologic agent of myopathies in animals. Am. J. Vet. Res. 26: 749-752.
- Graziano J.M., Flory W., Serger C. & Hebert C.D. 1983. Effects of a *Cassia occidentalis* extract in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). Am. J. Vet. Res. 44: 1238-1244.
- Hebert C.D., Flory W., Serger C. & Blanchard R.E. 1983. Preliminary isolation of a myodegenerative toxic principle from *Cassia occidentalis*. Am. J. Vet. Res. 44(7): 1370-1374.
- Henson J.B. & Dollahite J.W. 1966. Toxic myodegeneration in calves produced by experimental *Cassia occidentalis* intoxication. Am. J. Vet. Res. 27(119): 947-949.
- 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(2): 142-145.
- Kim L.H., Camp B. & Grigsby R.D.J. 1971. Isolation of N. Methymorpholine from the seeds of *Cassia occidentalis* L. (Coffee Senna). Agric. Food Chemy. 19(1): 198-199.
- Krogh P. 1977. Ochratoxins, p. 489-498. In: Rodricks J.V., Hesselstine C.W. & Mehlman M.A. (ed). Mycotoxins in human and animal health. Pathotox Publ., Illinois.
- Mercer H.D., Neal F.C., Himes J.A. & Edds G.T. 1967. *Cassia occidentalis* toxicosis in cattle. J. Am. Vet. Med. Assc. 151(6): 735-741.
- Moussu R. 1925. Compt. Rend. Soc. Biol. 92: 862. (Citado por Kim et al. 1971)
- 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 the 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. Res. 31: 2151-2156.
- O'Hara P.J. & Pierce K.R. 1974. A toxic cardiomyopathy caused by *Cassia occidentalis*. Vet. Path. 11: 110-124.
- Pierce K.R. & O'Hara P.J. 1967. Toxic myopathy in Texas cattle. Southwestern Vet. 30(2): 165-170.
- Read K., Pierce K.R. & O'Hara P.J. 1968. Ultrastructural lesions of an acute toxic cardiomyopathy of cattle. Laboratory Investigation 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.
- Simpson C.F., Damron B.L. & Harms R.H. 1971. Toxic myopathy of chicks fed *Cassia occidentalis* seeds. Avian Dis. 15: 284-290.
- Schmitz D.G. & Denton J.H. 1977. Senna bean toxicity in cattle. Southwestern Vet. 30(2): 165-170.
- 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.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE SORONEUTRALIZAÇÃO E IMUNODIFUSÃO NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA O VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY EM SUÍNOS¹

CARLOS H. ROMERO², CHERYL ANN ROWE², ROBIS S. FLORES³, LIANA BRENTANO³ e JOSÉ LUIZ MARQUES⁴

ABSTRACT.- Romero C.H., Rowe C.A., Flores R.S., Brentano L. & Marques J.L.L. 1985. [Comparison between the serum neutralization and the immunodiffusion tests for the detection of antibodies for Aujeszky's disease virus in swine.] Comparação entre os testes de soroneutralização e imunodifusão na detecção de anticorpos para o vírus da doença de Aujeszky em suínos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 5(3): 39-44. Centro Nac. Pesq. Suínos e Aves, Embrapa, Cx. Postal D-3, Concórdia, SC 89700, Brazil.

A comparison was made between the plate immunodiffusion (ID) test and the micro-serum neutralization (SN) test in the detection of antibodies for Aujeszky's disease virus (ADV) in pig sera, using a total of 813 sera derived from five infected herds. The plate ID test was as sensitive and specific as the micro SN test in detecting positive sera that possessed neutralizing activity only when tested undiluted. Sera with this titer generally reacted by bending the precipitation line formed between the antigen and the reference serum. Sera with SN titers equal to or greater than eight, usually gave two lines of precipitation. The plate ID test was equally efficient and specific in detecting antibodies resulting from a natural infection or from vaccination with an inactivated oil-emulsion vaccine, as well as maternally-derived antibodies in the sera of piglets from vaccinated sows. Of 813 sera assayed in the micro SN test, 295 (36.3%) contained ADV antibody, 382 (47%) were negative and 136 (16.7%) were toxic. The same sera assayed in the plate ID test showed 347 (42.7%) positive for precipitating antibodies and 466 (57.3%) negative. The major limitation of the SN test was the excessive percentage of sera (16.7%) that were toxic for the indicator cells (chicken embryo fibroblasts), due mainly to bacterial contamination and/or hemolysis as a result bad handling and storage of samples before arriving to the laboratory. The disagreement between the number of positive sera detected by the two tests in favor of the plate ID test, was due to the fact that 52 sera that were positive by this test were toxic when assayed by SN.

Under the experimental conditions, the plate ID test was both sensitive and specific for the detection of antibodies for ADV, and as well as being economic, simple and rapid to perform, there is the advantage that it can be used to test moderately contaminated and/or hemolysed sera that are toxic for the indicator cells in the SN test.

INDEX TERMS: Serum neutralization, immunodiffusion, diagnosis, Aujeszky, swine.

SINOPSE.- A comparação do teste de imunodifusão (ID) em placa e o microteste de soroneutralização (SN), na detecção de anticorpos para o vírus da doença de Aujeszky (VDA) em soros suínos, foi realizada em 813 soros oriundos de cinco plantéis infectados com o VDA. O teste de ID em placa foi altamente sensível e específico, detectando como positivos soros que, no micro-teste de soroneutralização, apenas reagiam quando eram testados sem diluir. Os soros com este título reagem, geralmente, dobrando a linha de precipitação formada entre o antígeno e o soro de referência. Soros com títulos SN de oito

ou superiores apresentavam freqüentemente duas linhas de precipitação. O teste de ID foi igualmente eficiente e específico na detecção de anticorpos da infecção natural, da vacinação com vacina inativada oleosa, bem como de anticorpos transferidos da porca para os leitões via colostro. De 813 soros submetidos ao teste de SN, 295 (36,3%) revelaram anticorpos, 382 (47%) eram negativos e 136 (16,7%) eram tóxicos. Os mesmos soros submetidos ao teste de ID, revelaram 347 (42,7%) positivos para anticorpos precipitantes enquanto que, 466 (57,3%) eram negativos. A maior limitação do teste de SN foi a excessiva percentagem de soros tóxicos (16,7%) para as células indicadoras (fibroblastos de embrião de galinha), principalmente, devido a contaminação bacteriana e/ou hemólise causada por deficiente dessoragem e estocagem antes de serem enviados ao laboratório. A discordância entre o número de soros detectados como positivos para anticorpos em favor do teste de ID, foi devido ao fato de que 52 soros positivos por este teste foram tóxicos

¹ Aceito para publicação em 3 de fevereiro de 1986.

² Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSA), Cx. Postal D-3, Concórdia, Santa Catarina 89700.

³ Bolsista da Embrapa-CNPSA.

⁴ Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), Concórdia, SC 89700.

no teste de SN. Nas atuais condições, o teste de ID foi sensível e específico na detecção de anticorpos para o VDA e tem a vantagem de ser econômico, simples e rápido de realizar, além de poder testar soros moderadamente contaminados e/ou hemolisados que são tóxicos para as culturas celulares utilizadas no teste de SN.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Soroneutralização, imunodifusão, diagnóstico, Aujeszky, suínos.

INTRODUÇÃO

A doença de Aujeszky (DA) ou pseudorraiva, tem adquirido, recentemente, maior importância econômica, especialmente em países com indústria suína intensiva e moderna (Akkermans et al. 1975, Leunen et al. 1975, Solorzano & Thawley 1979, Toma et al. 1983), devido ao incremento da incidência e da severidade da doença, não somente em leitões e em porcas gestantes, mas também em suínos de 14-18 semanas de idade (McFerran et al. 1979).

No Brasil, em áreas de exploração suínica intensiva, os transtornos causados pela infecção e pela doença parecem ser de idêntica gravidade aos relatados em outros países. Surtos com alta mortalidade de leitões tem acometido diversos plantéis no Estado de Santa Catarina (Rowe & Romero 1986) e Paraná (Romero C.H., resultados não publicados).

Para a avaliação epidemiológica sobre a prevalência e distribuição da infecção pelo herpes vírus da doença de Aujeszky (VDA), utilizam-se testes sorológicos que visam a detectar anticorpos específicos para o VDA. Testes sorológicos são também utilizados em programas de erradicação, os quais tem como base a testagem, identificação e a eliminação de suínos com anticorpos (Wright et al. 1982). O teste diagnóstico ideal deve ser sensível, específico, rápido e econômico e, que possa ser realizado em laboratórios de diagnóstico não necessariamente sofisticados.

Diversos testes sorológicos foram já desenvolvidos para detectar anticorpos para o VDA. Os testes que tiveram maior aceitação, a julgar pela frequência com que eles são utilizados são: o teste de soroneutralização realizado em microplacas, utilizando-se diversas células indicadoras e diferentes condições de incubação (Bitsch & Eskildsen 1976, Hill et al. 1977, Gutekunst et al. 1978, McFerran et al. 1979, Van Oirschot & Gielkens 1984), o ensaio imunoenzimático ou ELISA, desenvolvido para o VDA por Moutou et al. (1978) e modificado através da incorporação de antígeno controle (Todd et al. 1981), o microteste de imunodifusão (Gutekunst et al. 1978) e o teste de contraímunoelctroforese (Banks & Cartwright 1983).

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a especificidade e sensibilidade do teste de imunodifusão em placa desenvolvido no Laboratório de Virologia do CNPSA (Romero et al. 1984) comparado com o microteste de soroneutralização (Hill et al. 1977), na detecção de anticorpos para o VDA, em suínos naturalmente infectados ou vacinados contra a DA e de anticorpos maternos em leitões filhos de porcas vacinadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Imunodifusão

Para determinar a presença de anticorpos precipitantes no soro, foi utilizado o teste de imunodifusão (ID) dupla, em placa, realizado em gel de ágar, utilizando-se antígeno, soro de referência e condições de testagem similares àquelas previamente descritas (Romero et. al. 1984).

Soroneutralização

Com o objetivo de avaliar o título de anticorpos neutralizantes no soro, foi utilizado o teste de soroneutralização (SN) em microplacas, levando em consideração os padrões mínimos recomendados para o diagnóstico da pseudorraiva (Hill et al. 1977) com pequenas adaptações as nossas condições laboratoriais. O diluente utilizado em todas as fases do teste de SN era uma mistura de partes iguais dos meios de cultura Ham F10 e 199, adicionado de 5% do soro bovino, penicilina potássica cristalina (500 U/ml), sulfato de dihidroestreptomicina (500 µg/ml) e micostatina (50 U/ml). Os soros eram inativados em banho-maria a 56°C durante 30 minutos e testados na quantidade de 25 µl, sem diluir e em diluições duplas até a diluição final de 1:256. A cepa viral utilizada foi o VDA 438/83 (Rowe & Romero 1986) isolada no CNPSA, contendo 100 doses infectantes médias para culturas celulares (DICC₅₀) de fibroblastos de embrião de galinha (FEG) para cada 25 µl. As diluições de soro eram realizadas diretamente na microplaca, e, após adição de igual volume (25 µl, da suspensão contendo 100 DICC₅₀ de vírus, a microplaca era incubada a 37°C durante uma hora. Ao final deste período de incubação, eram adicionadas 100.000 células primárias de FEG preparadas segundo a técnica de Solomon (1975) e, contidas em 200 µl de diluente. As placas eram logo incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, ou lacradas com fita adesiva não tóxica e incubadas em estufa convencional a 37°C. Simultaneamente às titulações dos soros em teste, titulavam-se também soros de referência com e sem anticorpos para o VDA. Como controle intrínscio das 100 DICC₅₀, o vírus era testado em octuplicata em diluições decimais de 10⁻¹ a 10⁻⁵ partindo da diluição de trabalho utilizada no teste. A leitura dos testes era realizada após três e cinco dias de incubação, quando a leitura da titulação viral indicava 100 DICC₅₀.

Soros para os estudos comparativos

O sangue foi colhido com agulha por punção da veia jugular, da veia cava anterior ou da veia marginal da orelha de suínos de cinco granjas localizadas nos estados do Paraná e Santa Catarina. Após coagulação, o soro era separado, centrifugado e congelado a -20°C até seu processamento para ambos os testes. Outras vezes, o sangue era dessorado a nível de campo e, após dias ou semanas da colheita, os soros eram enviados a nosso laboratório, não raramente acusando diversos graus de contaminação e/ou hemólise. A origem dos soros foi a seguinte:

Soros da Granja A. Obtiveram-se 149 soros de suínos adultos não vacinados contra a DA pertencentes a uma granja de terminação localizada no Município de Ipumirim, Santa Catarina. Esta granja tinha recentemente sido acometida de surto da DA, confirmado através de isolamento viral (VDA 879/84) no CNPSA.

Soros da Granja B. Foram obtidos 304 soros de suínos adultos não vacinados contra a DA pertencentes a uma granja de terminação localizada no Município de Toledo, Paraná. Apesar de se haver introduzido nesta granja suínos de um outro plantel que tinha sofrido surto da DA, os suínos desta granja não apresentaram sintomas indicativos da DA.

Soros da Granja C. Obtiveram-se 110 soros de suínos adultos não vacinados contra a DA, pertencentes a uma granja de reprodutores localizada no Município de Nova Santa Rosa, Paraná, e que tinha sido afetada com surto da DA clínica dois meses antes.

Soros da Granja D. Estes soros foram obtidos de 44 porcas e de 45 leitões de uma granja multiplicadora localizada no Município de Faxinal do Guedes, Santa Catarina. Alguns meses atrás, a granja tinha sido acometida de surto da DA clínica cujo diagnóstico foi realizado no Laboratório de Virologia do CNPSA, com isolamento viral (VDA 607/83).

Com o objetivo de diminuir as perdas econômicas, tinha-se iniciado programa de vacinação contra a DA com vacina inativada oleosa; as porcas foram vacinadas a partir da 2ª semana de gestação, enquanto que os leitões eram vacinados às seis semanas de idade.

Soros da Granja E. Obtiveram-se soros de 80 porcas, 25 leitões e de 56 cachos pertencentes a uma granja de reprodutores localizada no Município de Xanxerê, Santa Catarina. Alguns meses atrás, esta granja tinha sido afetada por surto da DA clínica, com isolamento viral de encéfalo de leitões doentes (VDA 467/83) e, com o intuito de diminuir as perdas econômicas devidas a DA, as porcas tinham sido imunizadas com vacina inativada oleosa entre os 70 e 80 dias de gestação. Os cachos e os leitões não foram vacinados. Estes últimos tinham entre 3 e 4 semanas de idade quando foram sangrados para a avaliação de anticorpos.

RESULTADOS

O teste de ID em placa foi comparado ao microteste de SN, teste quantitativo considerado como de referência para a detecção de anticorpos para o VDA, para determinar a sua sensibilidade e especificidade. Os resultados correspondentes às granjas A, B e C foram analisados juntos por corresponder a soros oriundos de suínos não vacinados e, são apresentados no Quadro 1. Os resultados indicaram que quando os soros são negativos no teste de SN, eles são também negativos no teste de ID (100 por cento de especificidade) e, quando o título de anticorpos neutralizantes é, igual ou maior que dois, o teste de ID é sempre positivo (100 por cento de sensibilidade). Por outro lado, 43 (45,3%) de 95 soros que foram tóxicos no teste de

SN, continham anticorpos precipitantes detectáveis no teste de ID.

Quando ambos os testes foram utilizados para avaliar a presença de anticorpos no soro de porcas vacinadas das granjas D

Quadro 1. *Comparação entre os testes de SN e ID na detecção de anticorpos para o VDA em soros de suínos adultos não vacinados mas naturalmente infectados com o VDA, das granjas A, B e C.*

Título SN	Nº de soros com título SN indicado	Nº de ID soros +/testados	ID(c)	
			Sensibilidade %	Especificidade %
Tóxico(a)	95	43/95	NA(d)	NA
Negativo(b)	344	0/344	NA	100
	2	8/8	100	100
	4	17/17	100	100
	8	25/25	100	100
	16	21/21	100	100
	32	21/21	100	100
	64	14/14	100	100
	128	17/17	100	100
	256	1/1	100	100

(a) Soro tóxico para as células indicadoras entre as diluições 1:2 a 1:128. Títulos expressos com a recíproca da diluição que neutralizou 100 DICC₅₀ do VDA.

(b) Correspondente a soro não diluído.

(c) Sensibilidade e especificidade do teste de ID quando comparado ao teste de referência de SN.

(d) Não aplicável.

Quadro 2. *Comparação entre os testes de SN e ID na detecção de anticorpos para o VDA em soros de porcas vacinadas das granjas D e E*

Vacinação	Testagem	Título SN	Nº de soros com título SN indicado	ID +	Nº de soros testados	ID(c)	
						Sensibilidade %	Especificidade %
Gestação 2 semanas	Gestação 14 semanas	2	1	1/1	100	100	
		4	2	2/2	100	100	
		8	3	3/3	100	100	
		16	2	2/2	100	100	
		32	4	4/4	100	100	
		64	1	1/1	100	100	
Gestação 4 semanas	Gestação 12 semanas	4	1	1/1	100	100	
		8	3	3/3	100	100	
		16	3	3/3	100	100	
		32	3	3/3	100	100	
		64	2	2/2	100	100	
		128	2	2/2	100	100	
≥ 256	1	1/1	100	100			
Gestação 10 semanas	Gestação 13-16 semanas	Tóxico(a)	4	1/4	NA(d)	NA	
		2	1	1/1	100	100	
		4	5	5/5	100	100	
		8	8	8/8	100	100	
		16	10	10/10	100	100	
		32	23	23/23	100	100	
		64	22	22/22	100	100	
		128	6	6/6	100	100	
256	1	1/1	100	100			
Gestação 14 semanas	Lactação 2 semanas	4	2	2/2	100	100	
		8	2	2/2	100	100	
		16	4	4/4	100	100	
		32	4	4/4	100	100	
		64	3	3/3	100	100	
	128	1	1/1	100	100		

(a, c, d) Vide Quadro 1.

Quadro 3. Comparação entre os testes de SN e ID na detecção de anticorpos para o VDA em soros de leitões vacinados (Granja D) e não vacinados (Granja E) contra a doença de Aujeszky

Granja	Idade Semanas	Título SN	Nº de soros com título SN indicado	ID +	Nº de soros testados	ID(c)	
						Sensibilidade %	Especificidade %
D Vacinados	10	Tóxico(a)	8	6/8		NA(d)	NA
		2	5	5/5	100	100	
		4	3	3/3	100	100	
	14	Tóxico	14	2/14		NA	NA
	18	Tóxico	14	0/14		NA	NA
		4	1	1/1		100	100
E Não vacinados	3-4	4	3	3/3		100	100
		8	4	4/4		100	100
		16	8	8/8		100	100
		32	8	8/8		100	100
		64	1	1/1		100	100
		128	1	1/1		100	100

(a, c, d) Vide Quadro 1.

Quadro 4. Comparação entre os testes de SN e ID na detecção de anticorpos para o VDA em soros de cachaços da granja E

Título SN	Nº de soros com título SN indicado	ID + / Nº de soros testados	ID(c)	
			Sensibilidade %	Especificidade %
Tóxico(a)	1	0/1	NA(d)	NA
Negativo(b)	38	0/38	NA	100
ND(e)	2	2/2	100	100
8	3	3/3	100	100
16	5	5/5	100	100
32	3	3/3	100	100
64	3	3/3	100	100
≥128	1	1/1	100	100

(a, b, c, d) Vide Quadro 1.

(e) Não diluído.

e E, todos os soros com títulos de anticorpos neutralizantes igual ou maior que dois continham anticorpos precipitantes detectáveis no teste de ID (Quadro 2). Um (25%) de quatro soros tóxicos no teste de SN foi positivo no teste de ID.

Os resultados de ambos os testes realizados utilizando-se soros de leitões indicaram também que soros com níveis de anticorpos neutralizantes iguais ou maiores que dois são sempre positivos no teste de ID (Quadro 3). Alguns soros de leitões que foram tóxicos no teste de SN, foram positivos no teste de ID. Quando a avaliação foi realizada em soros de cachaços da granja E, verificou-se que todos os soros positivos no teste de SN, também o foram pelo teste de ID (Quadro 4). Os 38 soros com resultados negativos no teste de SN, também foram negativos no teste de ID.

Finalmente, considerando os resultados globais fornecidos pelos testes de SN e ID, verificou-se que de 813 soros testados

Quadro 5. Resultados globais do estudo comparativo entre os testes de SN e ID na detecção de anticorpos para o VDA em soros suínos

Granja	Suínos	Tipo de infecção	Nº de soros testados	Soroneutralização			Imunodifusão	
				+	-	Tóxicos	+	-
A	Adultos	Natural(a)	149	77	55	17	81	68
B	Adultos	Natural	304	6	289	9	6	298
C	Adultos	Natural	110	41	0	69	80	30
D	Porcas	Vacinação(b)	44	44	0	0	44	0
D	Leitões	Vacinação	45	9	0	36	17	28
E	Porcas	Vacinação	80	76	0	4	77	3
E	Leitões	Antic. maternos(c)	25	25	0	0	25	0
E	Cachaços	Natural	56	17	38	1	17	39
Total			813	295	382	136	347	466
				(36,3%)	(47%)	(16,7%)	(42,7%)	(57,3%)

(a) Anticorpos correspondentes à infecção natural.

(b) Anticorpos formados como consequência da vacinação com vacina inativada oleosa.

(c) Anticorpos transferidos via colostro.

em ambas as provas, o teste de SN detectou 295 (36,3%) soros com anticorpos, 382 (47%) soros sem anticorpos e 136 (16,7%) soros foram tóxicos para as células indicadoras e, conseqüentemente, ficaram sem resultado (Quadro 5). Por outro lado, o teste de ID permitiu a detecção de 347 (42,7%) soros com anticorpos enquanto que 466 (57,3%) foram negativos.

DISCUSSÃO

O teste de ID em placa utilizado no presente estudo comparativo, difere consideravelmente do microteste de ID em lâmina, previamente desenvolvido (Gutekunst et al. 1978) e avaliado (Johnson et al. 1983) frente ao teste de SN para o VDA. A extrema sensibilidade de nosso teste em placa pode ser conseqüência do procedimento utilizado para preparar o antígeno de referência. Acredita-se que, a concentração das proteínas virais através da diálise em polietilenoglicol (Romero et al. 1984), seja mais eficiente na recuperação dos dois antígenos virais reagentes do VDA, quando comparada com o método de precipitação com sulfato de amônia (Gutekunst et al. 1978). Todavia, no teste de ID em placa, os soros e o antígeno são utilizados em volumes de 100 μ l, aproximadamente quatro vezes os volumes utilizados no microteste de ID em lâmina. Este fator quantitativo poderia também ter sido determinante na obtenção dos bons resultados.

A sensibilidade do teste de ID em placa foi de 100% para todos os soros que possuíam anticorpos neutralizantes para 100 DICC₅₀, independentemente do título. Soros que somente neutralizavam quando testados não-diluídos, reagiam geralmente dobrando a linha de precipitação formada entre o soro e o antígeno de referência. Este resultado contrasta com os obtidos por Johnson et al. (1983), que encontraram no teste de ID em lâmina somente sensibilidade de 100% com soros com títulos de anticorpos de 64 ou mais. Esses autores verificaram que o teste em lâmina era de baixa sensibilidade com soros de título neutralizante igual ou menor que oito. No trabalho original, Gutekunst et al. (1978) observaram que o teste em lâmina tinha uma correlação perfeita com o teste de SN apenas no caso de soros com título neutralizante igual ou superior a 16. Uma segunda linha de precipitação era geralmente observada em soros com título igual ou superior a oito. Esta é a primeira vez que se reporta esta segunda antigenicidade e, que provavelmente, é devida a qualidade do antígeno utilizado. Banks & Carwright (1983) indicaram que o teste de ID em lâmina não era tão eficiente como os testes de ELISA e o de SN na detecção de anticorpos para o VDA, porém, esses autores utilizaram água destilada em vez de tampão Tris (Gutekunst et al. 1978), o que poderia ter afetado os resultados significativamente.

O teste de ID em placa foi sensível tanto na detecção de anticorpos da infecção natural com o VDA e da vacinação com vacina inativada oleosa. Estes resultados são diferentes dos obtidos por Johnson et al. (1983), que verificaram ser o teste de ID em lâmina, mais eficiente na detecção de anticorpos produzidos na infecção natural com vírus de campo do que na vacinação com uma cepa viral viva modificada.

O teste de ID foi também altamente específico na detecção de anticorpos para o VDA de origem materna, da vacinação ou da infecção natural. Em nenhum caso foi encontrado um soro que fosse positivo para anticorpos precipitantes e negativo para anticorpos neutralizantes.

Poucos foram os soros suínos que reagiram com componentes do soro bovino contido no antígeno de referência no teste de ID. Esta reação, de uma maneira geral, não interferia com a leitura da prova. Resultados de ensaios preliminares demonstraram que antígenos preparados de culturas celulares com aproximadamente 1% de soro bovino, possuíam, constantemente, maior potência que antígenos preparados de culturas celulares isentas de soro.

O soro de referência utilizado no teste de ID é da maior importância para facilitar a leitura da prova. Deve-se escolher soros que forneçam uma ou duas linhas de precipitação claras, mas não exageradamente fortes. Como recomendado por outros autores (Gutekunst et al. 1978), não devem ser utilizados como referência soros de suínos hiperimunes, por reagirem estes com linhas múltiplas que não reagem em comum com linhas de precipitação formadas por soros fracamente positivos ou com título neutralizante menor que dois.

O teste de ID em placa utilizado no presente estudo, é um teste simples, que requer de pouca destreza e nenhuma sofisticação. É um teste rápido e relativamente econômico, que fornece resultados preliminares em 24 horas e definitivos em 72 horas. Além disso, pode ser implementado em laboratórios que não manipulam culturas celulares e que não possuem equipamento sofisticado. A maior vantagem sobre o teste de SN, é a de poder avaliar soros tóxicos devido a contaminação e/ou hemólise, sem perder em sensibilidade e especificidade.

A principal limitação do teste de SN é, sem dúvida, a qualidade do soro a ser testado. No presente estudo, muito soros provinham de áreas relativamente distantes, e não tinham sido adequadamente processados e/ou estocados antes do envio ao laboratório. A percentagem de soros tóxicos foi excessivamente alta (16,7%) e, em todos os casos, somente no teste de SN, não teria sido possível um diagnóstico. Em todo programa de controle e erradicação, o diagnóstico sorológico rápido e acurado de todos os suínos infectados é um requerimento essencial e, quando suínos infectados não são propriamente identificados devido a toxicidade do soro, é imperativo utilizar um segundo teste para se obter um resultado que permita o diagnóstico em 100% dos suínos testados. O teste de ID preencheu os requisitos deste segundo teste. Enquanto que a SN permitiu a detecção de 295 soros com anticorpos dos 813 testados, o teste de ID detectou 347 soros positivos. A diferença em todos os casos foi devida a toxicidade dos soros, provavelmente com anticorpos neutralizantes de baixo título, e não a falta de sensibilidade do teste de SN. Problemas similares foram encontrados no Estado de Missouri, EUA, no início da implementação do teste de SN (Solorzano & Thawley 1979). Acredita-se que através da divulgação da necessidade da utilização de técnicas assépticas mais rigorosas para a sangria de suínos, assim como do processamento e estocagem rápida dos soros obtidos, possa-se num futuro próximo, obter índices mais reduzidos de toxicidade no teste de SN.

Agradecimentos.- Agradecemos a excelente assistência técnica de Auria Dartora e Ivane Müller.

REFERÊNCIAS

- Akkermans J.P.W.M., Rondhuis P.R. & Wirahadiredja R.M.S. 1975. Observations on Aujeszky's disease in the Netherlands. *Bull. Off. Int. Epiz.* 84: 179-194.
- Banks M. & Cartwright S. 1983. Comparison and evaluation of four serological tests for detection of antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.* 113: 38-41.
- Bitsch V. & Eskildsen M. 1976. A comparative examination of swine sera for antibody to Aujeszky virus with the conventional test and a modified virus-serum neutralization test and a modified direct complement fixation test. *Acta. Vet. Scand.* 17: 142-152.
- Gutekunst D.E., Pirtle E.C. & Mengeling W.L. 1978. Development and evaluation of a microimmunodiffusion test for detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. *Am. J. Vet. Res.* 39: 207-210.
- Hill H.T., Crandell R.A., Kanitz C.L., McAdaragh J.P., Seawright G.L., Solorzano R.F. & Stewart W.C. 1977. Recommended minimum standards for diagnostic tests employed in the diagnosis of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Proc. 20th Annu. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost.*, p. 375-390.
- Johnson M.E., Thawley D.G., Solorzano R.F. & Wright J.C. 1983. Evaluation of the microimmunodiffusion test for the detection of antibody to pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 44: 28-30.
- Leunen J., De Meurichy W. & Pensaert M. 1975. La maladie d'Aujeszky en Belgique. *Bull. Off. Int. Epiz.* 84: 171-178.
- McFerran J.B., Dow C. & McCracken R.M. 1979. Experimental studies in weaned pigs with three vaccines against Aujeszky's disease. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2: 327-334.
- Moutou F., Toma B. & Fortier B. 1978. Application of an enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of Aujeszky's disease in swine. *Vet. Rec.* 102:264.
- Romero C.H., Rowe C.A., Provenzano G.I., Flores R.S., Brentano L. & Marques J.L.L. 1984. Distribuição e prevalência de anticorpos precipitantes para o vírus da doença de Aujeszky em plantéis suínos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* 4(4): 123-127.
- Rowe C.A. & Romero C.H. 1986. Isolamento e identificação do vírus da doença de Aujeszky de surtos em suínos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* (Submetido para publicação)
- Solomon J.J. 1975. Preparation of avian cell cultures. *Tiss. Cult. Ass. Man.* 1: 7-11.
- Solorzano R.F. & Thawley D.G. 1979. Laboratory studies of pseudorabies. *Proc. 22nd Annu. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diag.*, p. 157-168.
- Todd D., McNair J., McNulty M.S. & McFerran J.B. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Aujeszky's disease virus in pigs. *Vet. Rec.* 109: 534-537.
- Toma B., Lorant J.M., Ursache R., Vigouroux A., David C., Bijlenga G., Rose R., Duee J.P., Alamagny A., Laurent J., Goyon M. & Le Gardinier J.C. 1983. La maladie d'Aujeszky en France en 1982. *Rec. Méd. Vét.* 159(5): 493-498.
- Van Oirschot J.T. & Gielkens A.L.J. 1984. In vivo and in vitro reactivation of latent pseudorabies virus in pigs born to vaccinated sows. *Am. J. Vet. Res.* 45: 567-571.
- Wright J.C., Thawley D.G. & Solorzano R.F. 1982. Field evaluation of test-and-removal and vaccination as control measures for pseudorabies in Missouri swine. *Can. J. Comp. Med.* 46: 420-425.

MIELOENCEFALITE EQUINA POR PROTOZOÁRIO¹

CLAUDIO SEVERO LOMBARDO DE BARROS², SEVERO SALES DE BARROS²,
MURILO NOGUEIRA DOS SANTOS², CARLOS ANTÔNIO MONDINO SILVA³ e FABIO WAIHRICH⁴

ABSTRACT.- Barros C.S.L., Barros S.S., Santos M.N., Silva C.A.M., Waihrich F. 1986. [Equine protozoal myeloencephalitis. Mieloencefalite equina por protozoário. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 6(2): 45-49. Depto Patologia, Univ. Fed. Sta. Maria, 97100 Santa Maria, RS, Brazil.

The occurrence of two cases of equine protozoal myeloencephalitis in a breeding establishment in southern Brazil is described. One of the horses, a 10-year-old thoroughbred mare, presented progressive incoordination of gait in the hind limbs for 15 days. Initially she was lame and dragged her toes while galloping. She was treated with high doses of dexamethazone which seemed to deteriorate her clinical condition. She was then euthanized and necropsied. Reddened, soft, granular areas appeared at the cut surface of spinal cord segments. Microscopically these areas corresponded to marked inflammatory and degenerative changes among which protozoal microorganisms were detected. Milder inflammatory changes were also found in the brain. The other affected animal was also a 10-year-old thoroughbred mare which presented similar clinical signs progressing to death within 60 days. No *post-mortem* examination was performed on this mare.

INDEX TERMS: Horse diseases, protozoal diseases, nervous system diseases, equine myeloencephalitis.

SINOPSE.- É notificada a ocorrência de dois casos de mieloencefalite equina por protozoário num Haras do Rio Grande do Sul. Um dos animais, uma égua Puro Sangue de Corrida de 10 anos, apresentou incoordenação progressiva dos membros posteriores por um período de 15 dias. Os sinais começaram com claudicação. O animal arrastava as pinças dos membros posteriores ao galopar. Os sinais clínicos agravaram-se após terapia com altas doses de dexametasona. O animal foi sacrificado e, na necropsia, áreas avermelhadas, amolecidas e granulares foram detectadas na superfície de corte da medula espinhal. Microscopicamente essas áreas correspondiam a lesões inflamatórias e degenerativas acentuadas em meio as quais percebiam-se microrganismos protozoários. Lesões inflamatórias mais discretas eram observadas também no cérebro. O outro animal, também uma égua Puro Sangue de Corrida de 10 anos, apresentou sinais clínicos semelhantes que progrediram para a morte em 60 dias. Nesse caso, não foi realizada necropsia.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de eqüinos, doenças por protozoário, doenças do sistema nervoso, mieloencefalite equina.

INTRODUÇÃO

A mieloencefalite equina por protozoário (MEP) é uma doença inflamatória do sistema nervoso central, especialmente da medula (Scarratt 1983) produzida por um parasita coccídio inicialmente identificado como *Toxoplasma gondii* (Cusick et al. 1974). Porém, a maioria dos animais afetados com a MEP não possui títulos significativos de anticorpos contra *T. gondii* (Cusick et al. 1974, Dubey et al. 1974, Mayhew et al. 1981). Além disso estudos sorológicos (Mayhew et al. 1981) e morfológicos (Dubey 1976, Simpson & Mayhew 1980) indicam que um *sarcocystis* é o agente etiológico.

A MEP é hoje uma entidade bem conhecida nos EUA. Já foram descritos casos em Nova York (Rooney et al. 1970, Mayhew et al. 1981), Illinois (Cusick et al. 1974), Pensilvânia (Beech & Dodd 1974), Ohio (Dubey et al. 1974), Flórida (Simpson & Mayhew 1980) e Califórnia (Dorr et al. 1984). Fora dos EUA a doença é praticamente desconhecida. Dois casos foram descritos na parte oeste do Canadá (Clark et al. 1981) e no Brasil uma doença essencialmente idêntica foi observada em cavalos Puro Sangue de Corrida em São Paulo. A doença foi interpretada nesses casos como sendo causada por *Toxoplasma gondii* devido ao fato de que alguns animais afetados mostravam titulação alta de anticorpos contra esse parasita (Macruz 1980). Porém *T. gondii* nunca foi isolado desses casos e não há descrições morfológicas das lesões encontradas.

Os sinais clínicos da MEP caracterizam-se por quedas, tropeços, incoordenação assimétrica dos membros, fraqueza muscular (Mayhew et al. 1976, Scarratt 1983) sendo que um dos pri-

¹ Aceito para publicação em 18 de fevereiro de 1986.

Um resumo deste trabalho foi apresentado no 10^o Encontro de Pesquisas Veterinárias, Jaboticabal, SP, em novembro de 1985.

² Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97100 Santa Maria, Rio Grande do Sul.

³ Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM.

⁴ Med. Vet. Autônomo, Júlio de Castilhos, Rio Grande do Sul.

meios sinais a ser notado é claudicação intermitente (Mayhew et al. 1976). A evolução é variável (1 e 3 semanas) porém casos de vários meses têm sido descritos (Mayhew et al. 1976). Normalmente cavalos adultos jovens são os mais comumente afetados. Mayhew et al. (1976) dão como média de idade 4,5 anos porém casos de alguns meses (Dorr et al. 1984) até 15 anos (Simpson & Mayhew 1980) já foram registrados. Parece haver uma maior frequência em animais de raça "Standard-bred" e em animais usados na reprodução e corridas (Mayhew et al. 1976). Os achados de necropsia restringem-se ao sistema nervoso central. Na superfície de corte da medula e do cérebro aparecem áreas avermelhadas, amolecidas localizadas tanto na substância branca como na substância cinzenta. Microscopicamente a lesão é de uma mieloencefalite necrotizante multifocal (Scarrat 1983). Em meio a essas lesões os parasitas protozoários são vistos em cerca de metade dos casos (Mayhew et al. 1976).

Relatamos aqui a ocorrência de 2 casos de MEP em éguas Puro Sangue de Corrida em um Haras do município de Júlio de Castilhos, Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Entre os anos de 1981 e 1983, 2 casos de ataxia locomotora progressiva ocorreram em éguas Puro Sangue de Corrida que estavam na reprodução em um Haras do município de Júlio de Castilhos, RS. Ambos os animais tinham 10 anos de idade. Num dos casos a doença progrediu para a morte do animal em cerca de 60 dias após o aparecimento dos sinais clínicos. Não foi procedida a necropsia. O outro animal apresentou sintomatologia semelhante e veio a ser sacrificado com injeção endovenosa de sulfato de magnésio 15 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas. Uma necropsia completa foi realizada nesse animal. Material de vários órgãos, inclusive sistema nervoso central foram colhidos, fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina e corados pela Hematoxilina e Eosina. Métodos especiais como a impregnação por prata e PAS foram empregados em cortes selecionados da medula espinhal. Os sinais clínicos, achados de necropsia e histopatologia do animal sacrificado serão descritos a seguir.

RESULTADOS

Sinais clínicos. O animal foi notado inicialmente por apresentar claudicação intermitente assimétrica dos membros posteriores. Ao ser tocado o animal arrastava a ponta dos cascos. Foi instituído um tratamento com altas doses de dexametazona o que agravou o quadro clínico. Dentro de 7 dias o animal apresentava acentuada incoordenação assimétrica dos membros posteriores, dificuldade em andar para trás, quedas sobre os membros posteriores, fraqueza muscular, movimentos dismétricos e, por vezes, andar em círculos. Aos quinze dias após o aparecimento dos sintomas o animal caía com facilidade e não conseguia se levantar sem ser ajudado. O proprietário optou, então, pelo sacrifício.

Achados de necropsia. As lesões pertinentes estavam restritas à parte tóraco-lombar da medula espinhal. Ao exame de cortes transversais desses segmentos medulares observaram-se áreas focais amolecidas, avermelhadas e com um aspecto granular. Aneurisma e trombose moderados foram observados como lesões incidentais na artéria mesentérica anterior.

Histopatologia. O exame microscópico revelou acentuada reação inflamatória dos segmentos tóraco-lombares da medula espinhal (Fig. 1). Os espaços perivascularares de Virchow-Robin encontravam-se distendidos e infiltrados por linfócitos, plasmócitos e monócitos (Fig. 2). Lesões degenerativas e necróticas acompanhavam as alterações inflamatórias: desmielinização, tumefação axonal e infiltração por "gitter cells" eram observadas principalmente na substância branca. Transformação gemistocística de astrócitos com formação ocasional de células gigantes era vista ao redor das lesões. Na substância cinzenta aparecia gliose focal e focos hemorrágicos perivascularares. As lesões no cérebro eram observadas apenas microscopicamente e eram mais brandas que as da medula. Na região talâmica e no tronco encefálico, discretos focos de manguitos perivascularares de células mononucleares eram observados. Nos cortes da medula observavam-se grupos de organismos basofílicos arredondados ou alongados medindo cerca de 2 μ m de comprimento e localizados extra-ou intracelularmente em meio às lesões. Quando localizados extracelularmente, esses organismos formavam agregações contidas em estruturas róseas arredondadas ou ovaladas (Fig. 3). Quando de localização intracelular eram encontrados no citoplasma de células macrofágicas, endoteliais, neurônios (mais raramente) ou de células não identificadas. Impregnações pela prata e colorações pelo PAS não revelaram uma parede de "pseudocisto" em volta dos agrupamentos do parasita nem esse tomava essas colorações.

DISCUSSÃO

O diagnóstico da MEP baseia-se nos sinais clínicos, achados de necropsia, na histopatologia e identificação dos microorganismos associados às lesões (Dorr et al. 1984). Sinais clínicos, lesões e microorganismos encontrados no presente estudo guardam semelhança estreita àqueles descritos em outros relatos de MEP (Cusick et al. 1974, Beech & Dodd, 1974, Dubey et al. 1974, Mayhew et al. 1976, Clark et al. 1981, Dorr et al. 1984). Apesar da semelhança do parasita encontrado na MEP com *T. gondii* ter sido assinalada (Cusick et al. 1974, Dubey et al. 1974), características tintoriais desse último parasita, como positividade na reação de PAS e impregnação por prata (Beech & Dodd 1974), não foram encontradas nesse caso. Testes sorológicos infelizmente não foram efetuados em nenhum dos animais do presente estudo.

Alguns dos sinais clínicos observados (dificuldade em andar para trás, quedas sobre os membros pelvicos) são compatíveis com envolvimento tóraco-lombar da medula espinhal (deLahunta 1977), locais onde as lesões eram mais acentuadas. Os sinais de fraqueza muscular são indicativas de lesão da substância cinzenta (deLahunta 1977) que de fato estavam presentes no animal necropsiado e que auxiliam no diagnóstico diferencial de outras afecções da medula em cavalos.

Pode-se especular que uma imunossupressão provocada nesse caso pela administração de altas doses de dexametazona tenha sido responsável pela reativação de uma infecção crônica latente e posterior agravamento do quadro clínico. Situações semelhantes já foram documentadas (Dubey et al. 1974, Dorr et al. 1984) e parecem ser uma indicação clínica auxiliar no

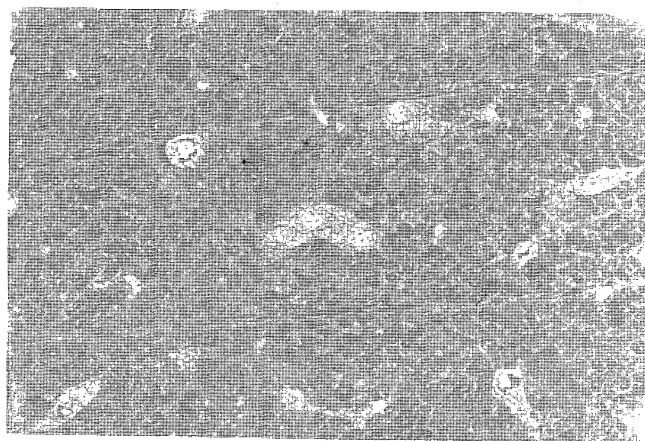


Fig. 1. *Mieloencefalite Equina por protozoário. Corte transversal da parte torácica da medula. Observam-se múltiplos manguitos perivasculars de células inflamatórias. Lesões degenerativas desmielinizantes são também vistas dando um aspecto redilhado à substância branca. HE, obj. 2,5.*

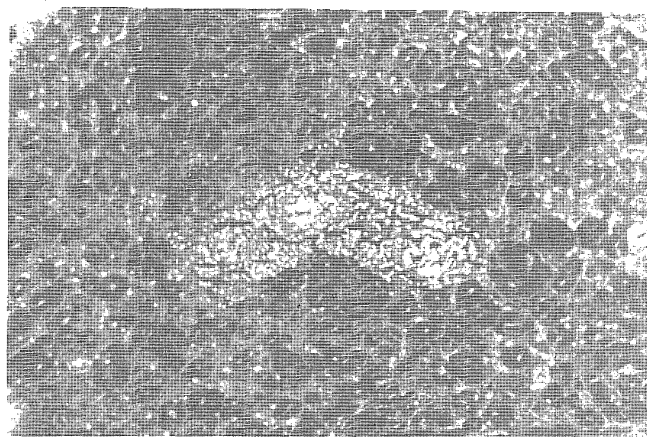


Fig. 2. *Mieloencefalite Equina por protozoário. Com maior aumento do campo da Fig. 1, observa-se a infiltração de células mononucleares no espaço perivascular de Virchow-Robin e dilatação das bainhas de mielina. HE, obj. 6,3.*

diagnóstico (Mayhew 1985, comunicação pessoal). Situações semelhantes de ativação de infecções latentes por protozoários (*Toxoplasma gondii*) ocorrem em pacientes imunossuprimidos tanto em humanos (Handler et al. 1983) como em animais (Dubey & Frenkel 1974, Brewer 1984).

O presente estudo envolve dois casos com sinais clínicos semelhantes. A etiologia por protozoário foi confirmada pela necropsia e exames histopatológicos em apenas um caso. Pode-se porém supor, baseado no exame clínico, que o outro caso tenha sido também de MEP.

Casos de doença neurológica em equinos com sinais clínicos semelhantes aos aqui descritos não são incomuns em nosso meio, porém a etiologia desses casos quase nunca é adequadamente investigada. O fator limitante nesses casos explica-se pelo fato que a necropsia de grandes animais, com retirada do sistema nervoso central, é trabalhosa, requerendo tempo e dedicação. A incidência dessa doença poderia revelar-se maior, caso o estudo do sistema nervoso central em equinos fosse executado adequada e rotineiramente.

O diagnóstico da MEP não oferece dificuldades quando os microorganismos são evidenciáveis em meio às lesões características e quando há uma boa associação com o quadro clínico. No presente caso as lesões foram mais acentuadas na medula espinhal como acontece em outros relatos (Beech & Dodd 1974, Cusick et al. 1974, Dubey et al. 1974, Clark et al. 1981, Dorr 1984). A natureza das lesões é primariamente inflamatória e afeta tanto a substância branca como a cinzenta.

Quando afeta principalmente a medula, a MEP deve ser diferenciada de várias outras doenças neurológicas que se manifestam por sinais clínicos de incoordenação em equinos e que talvez, são mais frequentes. Entre essas estão: a) as lesões produzidas por malformações das vértebras cervicais, a chamada mielopatia por estenose das vértebras cervicais (MEVC), nessa afecção, popularmente conhecida como "bambeira" e que corresponde à síndrome de "Wobbles" da literatura americana, há lesões degenerativas focais da medula espinhal cervical resul-

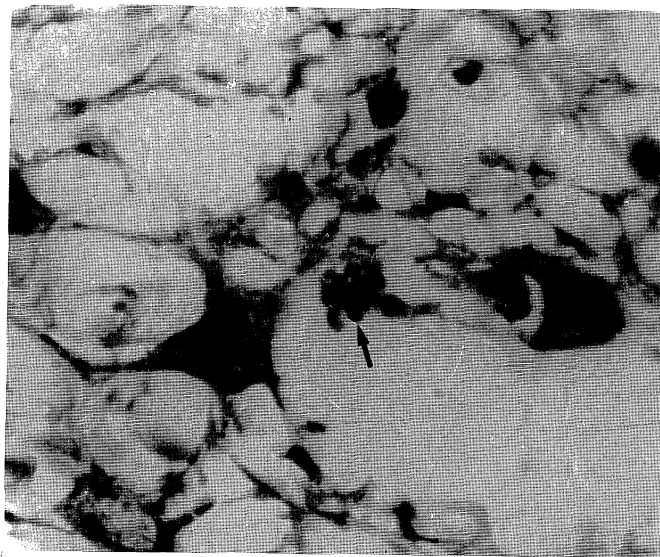


Fig. 3. *Mieloencefalite Equina por protozoário. Microrganismos protozoários são vistos em corte do segmento torácico da medula como um agregado extracelular de estruturas basofílicas (seta). HE, obj. 100.*

tante de estreitamento-anatômico, funcional ou de ambos dos forâmens entre as vértebras cervicais C₂ e C₇ (Jubb et al. 1985); b) a mieloencefalopatia degenerativa dos cavalos (MEDC) (Mayhew et al. 1977); c) a mieloencefalite por herpesvirus (MEH) (Jackson & Kendrick 1971, Charlton et al. 1976, Little & Thorsen 1976); d) a nematodíase cerebroespinhal (NC) (Swanstrom et al. 1969, Little 1972, Little et al. 1974); e) simples traumatismos (deLahunta 1977).

Cavalos afetados pela MEVC são geralmente mais novos, a doença torna-se evidente nos primeiros 12 a 15 meses de vida, embora, em alguns casos, possa ser detectada mais tarde, ao redor dos 4 anos (Jubb et al. 1985). Além disso, os sinais clínicos

da MEP são mais acentuados e progressivos, a fraqueza muscular (denotando envolvimento da substância cinzenta) e ataxia são mais acentuadas (Mayhew et al. 1977, Scarratt 1983). Exames radiológicos geralmente mostram um estreitamento do canal vertebral cervical nos casos de MEVC (Scarrett 1983) o que pode ser confirmado pela necropsia. As lesões na MEVC são mais restritas à porção cervical, afetam principalmente a substância branca e são primordialmente degenerativas (Jubb et al. 1985).

A MEDC é uma doença de cavalos jovens com idade média de aparecimento aos 6 meses. Produz lesões mais simétricas e a substância cinzenta é poupada (Mayhew et al. 1977). Assim os animais apresentam incoordenação simétrica e não apresentam sinais de fraqueza muscular relativos à alteração de substância cinzenta.

A MEH tem um aparecimento clínico súbito, envolve vários animais de todas as idades em uma mesma propriedade, cursa com febre e paralisia de bexiga com gotejamento contínuo de urina. Os sinais clínicos mantêm-se estáveis após 2-3 dias. A doença está associada a casos de afecções respiratórias e abortos nos outros animais do rebanho (Jackson & Kendrick 1971, Charlton et al. 1976, Little & Thorsen 1976). Testes sorológicos pareados revelam aumento de anticorpos neutralizantes contra o agente causal, o Herpesvírus equino-1 (Jackson & Kendrick 1977), o que ajuda sobremaneira na diferenciação clínica. As lesões histopatológicas na MEH são distintas por apresentarem uma vasculite necrótica nas leptomeninges (deLahunta 1977). As lesões são mais acentuadas na substância branca e na maioria das vezes mais do tipo inflamatório do que degenerativas e se orientam ao longo dos vasos (Jackson & Kendrick 1971). Lesões inflamatórias no gânglio de Gasser estão consistentemente presentes (Charlton et al. 1976).

Migrações de larvas de nematódios, geralmente *Strongylus vulgaris*, podem produzir lesões que causam aparecimento abrupto de sinais clínicos de natureza local mas que podem ser confundidos com MEP. Nos casos de NC, um exame de líquido cefalorraquidiano indicará uma moderada pleocitose e eosinofilia (Innes & Saunders 1962, Scarratt 1983). As alterações histopatológicas são características, podem-se detectar tratos fistulosos revestidos por cápsulas glióticas, gemistócitos e infiltrados linfoplasmocitário e eosinofílico; dentre esses tratos visualizam-se as larvas (Little et al. 1974).

Traumatismos na coluna vertebral com uma repercussão na medula podem apresentar um quadro clínico semelhante à MEP. Nos casos de traumatismo porém, os sinais clínicos não são progressivos, tendem a ficar estáveis ou regredir e são focais (deLahunta 1977). Em casos de fratura geralmente há hipalgesia ou analgesia das áreas correspondentes aos segmentos afetados (Scarratt 1983).

Quando afeta difusamente o cérebro, o que é mais raro, a MEP pode ser confundida com doenças encefálicas comuns de equínos como as encefalomielites e vírus e a leucoencefalomalácia. Porém, a epidemiologia e as lesões características dessas duas doenças permitem o diagnóstico diferencial (Barros et al. 1984).

A fonte de infecção no presente caso é desconhecida. Há fortes evidências de que o protozoário que provoca a MEP seja

um *Sarcocystis* (Dubey 1976, Mayhew et al. 1976, Simpson & Mayhew 1980). *Sarcocystis* são protozoários coccídios que necessitam dois hospedeiros (Dubey 1976). A forma tecidual no hospedeiro intermediário ocorre geralmente nos músculos. Os hospedeiros definitivos abrigam o parasita no intestino e se contaminam ao ingerirem carne (músculos) de hospedeiros intermediários afetados. A ocorrência de *Sarcocystis* com produção de lesões inflamatórias no sistema nervoso central em animais já foi relatada em ovinos (Hartley & Blakemore 1974) e bovinos (Jolley et al. 1983). No caso da MEP os equínos seriam hospedeiros intermediários para os *Sarcocystis* de uma espécie ainda não identificada. Estudos revelam que alguns animais com MEP apresentam evidências sorológicas de infecção com *Sarcocystis cruzi* (Mayhew et al. 1978) embora a reprodução experimental da doença, usando oocistos de *S. cruzi*, não tenha sido conseguida (Mayhew et al. 1981). Por outro lado, já foi aventada a possibilidade que *Klossiella equi* seja o agente etiológico da MEP (Brown & Patton 1977), mas as evidências que suportam essa teoria são fracas. Algumas evidências epidemiológicas permitem suspeitar que pássaros possam estar envolvidos como hospedeiros definitivos desses parasitas (Mayhew 1985, comunicação pessoal).

Uma terapia específica para cavalos com MEP não foi ainda definida, embora a doença pareça ser tratável. Admite-se que sendo o agente etiológico um coccídio, seria sensível a drogas usadas contra *T. gondii*. Nessa linha, alguns autores têm tentado, com sucesso relativo, o tratamento da MEP com drogas inibidoras do ácido fólico como sulfas, pirimetamina e combinações sulfa-trimetropina (Mayhew et al. 1976, Scarratt 1983). Como tratamento com corticosteróides definitivamente agrava o quadro clínico da MEP (Dubey et al. 1974, Dorr et al. 1984, deLahunta 1977), essa terapia, comum em nosso meio em doenças neurológicas de equínos, deve ser prescrita com extremo cuidado.

Agradecimentos. - Os autores são gratos ao Prof. Ian Mayhew, Department of Medical Sciences, University of Florida, Gainesville, EUA, pela sua colaboração no estudo das preparações histológicas.

REFERÊNCIAS

- Barros C.S.L., Barros S.S., Santos M.N. & Souza M.A. 1984. Leucoencefalomalácia em equínos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 4: 101-107.
- Beech J. & Dodd D.C. 1974. *Toxoplasma*-like encephalomyelitis in the horse. *Vet. Pathol.* 11: 87-96.
- Brewer B.D. 1984. Therapeutic strategies involving antimicrobial treatment of the central nervous system in large animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185: 1217-1221.
- Brown T.T. & Patton C.S. 1977. Protozoal encephalomyelitis in horses (Letter). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171:492.
- Charlton K.M., Mitchell D., Girard A. & Corner A.H. 1976. Meningoencephalomyelitis in horses associated with equine herpesvirus 1 infection. *Vet. Pathol.* 13:59-68.
- Clark E.G., Townsend H.G.G. & McKenzie N.T. 1981. Equine protozoal myeloencephalitis: a report of two cases from Western Canada. *Can. Vet. J.* 22: 140-144.
- Cusick P.K., Sells D.M., Hamilton D.P. & Hardenbrock J. 1974. Toxoplasmosis in two horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 164: 77-80.
- deLahunta A. 1977. *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology.* W.B. Saunders, Philadelphia, p. 205-216.

- Dorr T.E., Higgins R.J., Dangler C.A., Madingan J.E. & Witham C.L. 1984. Protozoal myeloencephalitis in horses in California. J. Am. Vet. Med. Assoc. 185: 801-802.
- Dubey J.P. 1976. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and other coccidia of cats and dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 169:1061-1076.
- Dubey J.J., Davis G.W., Koestner A. & Kiryu K. 1974. Equine encephalomyelitis due to a protozoan parasite resembling *Toxoplasma gondii*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 165: 249-255.
- Dubey J.P. & Frenkel J.K. 1974. Immunity of feline toxoplasmosis modification by administration of corticosteroids. Vet. Pathol. 11: 350-354.
- Handler M., Ho V., Whelan M. & Budzilovich G. 1983. Intracerebral toxoplasmosis in patients with acquired immune deficiency syndrome. J. Neurosurg. 59: 994-1001.
- Hartley W.J. & Blakemore W.F. 1974. An unidentified sporozoan encephalomyelitis in sheep. Vet. Pathol. 14: 1-12.
- Innes J.R.M. & Saunders L.Z. 1962. Comparative neuropathology. Academic Press, New York, p. 531-569.
- Jackson T. & Kendrick J. 1971. Paralysis of horses associated with equine herpesvirus 1 infection. J. Am. Vet. Med. Assoc. 158: 1351-1357.
- Jolley W.R., Jensen R., Hancock H.A. & Swift L. 1983. Encephalitic sarcocystosis in a newborn calf. Am. J. Vet. Res. 44: 1908-1911.
- Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. 1985. Pathology of domestic animals. Vol. 1. 3rd ed. Academic Press, Florida, p. 31-32.
- Little P.B. 1972. Cerebrospinal nematodiasis of equidae. J. Am. Vet. Med. Assoc. 160: 1407-1413.
- Little P.B., Sein Lwin U. & Fretz P. 1974. Verminous encephalitis of horses: experimental induction with *Strongylus vulgaris* larvae. Am. J. Vet. Res. 35: 1501-1510.
- Little P.B. & Thorsen J. 1976. Disseminating necrotizing myeloencephalitis: a herpes-associated neurological disease of horses. Vet. Pathol. 13: 161-171.
- Macruz R. 1980. Citado por Mayhew I.G. & Greiner E.C. 1986. Equine protozoal diseases. Veterinary Clinics of North America. Equine Practice Symposium on Equine Parasitology. (No prelo)
- Mayhew I.G., deLahunta A., Whitlock R.H. & Geary J. 1977. Equine degenerative myeloencephalopathy. J. Am. Vet. Med. Assoc. 170: 195-201.
- Mayhew I.G., deLahunta A., Whitlock R.H. & Pollock V.H. 1976. Equine protozoal myeloencephalitis. Proc. 22nd Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Pract., p. 107-114.
- Mayhew I.G., deLahunta A., Whitlock R.H., Krock L. & Tasker J.B. 1978. Spinal cord disease in the horse. Cornell Vet. 68 (Suppl. 6): 1-207.
- Mayhew I.G., Fayer R. & Simpson C.F. 1981. Clinical, pathologic and epidemiologic observations on equine protozoal myeloencephalitis. Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Vet. Parasit., St. Louis, Missouri, n.p. (Abstract).
- Rooney J.R., Prickett M.E., Delaney F.M. & Crewn M.W. 1970. Focal myelitis-encephalitis in horses. Cornell Vet. 60: 454-501.
- Scarratt K.W. 1983. Equine protozoal myeloencephalitis, p. 365-367. In: Robinson N.E. (ed.) Current therapy in equine medicine. W.B. Saunders, Philadelphia, p. 365-367.
- Simpson C.F. & Mayhew I.G. 1980. Evidence for *Sarcocystis* as the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. J. Protozool. 27: 288-292.
- Swanstrom O.F., Rising J.L. & Carlton W.W. 1969. Spinal nematodiasis in a horse. J. Am. Vet. Med. Assoc. 155: 748-753.

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Mascagnia pubiflora* (Malpighiaceae) EM COELHOS¹

JÜRGEN DÖBEREINER², ALDO GAVA³, LUIZ BENONI CONSORTE³ e CARLOS HUBINGER TOKARNIA⁴

ABSTRACT.- Döbereiner, J., Gava A., Consorte L.B. & Tokarnia C.H. 1986. [Experimental poisoning by *Mascagnia pubiflora* (Malpighiaceae) in rabbits.] Intoxicação experimental por *Mascagnia pubiflora* (Malpighiaceae) em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 6(2): 51-57. Embrapa-UAPNPSA, Km 47, Seropédica, RJ 23851, Brazil.

The dried and powdered leaves or fruit of *Mascagnia pubiflora* Griseb., a plant toxic for cattle, were administered by stomach tube to 14 and 9 rabbits, respectively. The plant, stored in the shade at room temperature for two to nine months after collection in the State of Mato Grosso do Sul, was shown to be toxic for this species also. The fruit proved to be approximately six times more toxic than the leaves. Six grams of the dried leaves per kilogram of body weight killed four of five rabbits, 4 g/kg killed three of eight, while 2 g/kg did not kill the one rabbit receiving that dose. Regarding the fruit, doses of 1 g/kg or above killed the five rabbits in each group, but 0.5 g/kg did not kill the four rabbits of that group. The first symptoms of poisoning with leaves were noted between 6h 02min. and 45h 39min., and with fruit between 2h 18min. and 20 hours after administration. The course of the poisoning lasted two to three minutes in the case of the leaves, and one to two minutes in the case of the fruit. The main symptoms, identical for rabbits receiving leaves or fruit, were those of "sudden death": the rabbits made sudden violent, uncontrolled movements and fell on their side; respiration became difficult and the animals died. In both groups of rabbits post-mortem examination showed congestion of the liver, and secondly, congestion of the lungs, while histology revealed degenerative and vascular alterations in the liver, kidneys and heart. These experiments show that the rabbit can be used as a small experimental animal in the continuation of the studies on the toxic properties of *M. pubiflora*, and in the identification work of the toxic principles. It is probable that the leaves and fruit contain the same toxic elements.

INDEX TERMS: Poisonous plants, experimental plant poisoning. *Mascagnia pubiflora*, Malpighiaceae, rabbits, pathology.

SINOPSE.- As folhas e os frutos dessecados de *Mascagnia pubiflora* (Juss.) Griseb., planta tóxica a bovinos, foram administrados por sonda gástrica a 14 e 9 coelhos, respectivamente. A planta, colhida em setembro de 1984 no Estado de Mato Grosso do Sul e guardada na sombra à temperatura ambiente durante 2 a 9 meses, demonstrou possuir toxidez também para essa espécie animal. Em relação à dose letal das folhas, 6 g/kg mataram 4 de 5 coelhos, 4 g/kg mataram 3 de 8 coelhos, 2 g/kg não mataram o único coelho que recebeu a planta nessa dosagem; em relação aos frutos, doses a partir de 1 g/kg mataram todos os 5 coelhos, enquanto que 0,5 g/kg não matou nenhum dos 4 coelhos. Dessa maneira, os frutos foram cerca de 6 vezes mais tóxicos que as folhas. Os coelhos mostraram os primeiros sintomas de intoxicação, no caso das folhas, entre 6h 02min. e

45h 39min., e no caso dos frutos, entre 2h 18min. e 20 horas, após a sua administração. A evolução do quadro clínico, no caso das folhas, foi de 2 a 3 minutos, e no caso dos frutos, de 1 a 3 minutos. O quadro clínico foi o mesmo, tanto nos coelhos que receberam as folhas, como nos que receberam os frutos. Esse quadro foi o da "morte súbita", isto é, os coelhos, de repente faziam movimentos desordenados violentos, caíam de lado, tinham a respiração difícil e logo morriam. Também os achados de necropsia e as alterações histopatológicas eram os mesmos para os animais intoxicados pelas folhas e pelos frutos. O achado de necropsia mais comum foi congestão hepática, em segundo lugar foi congestão pulmonar. Nos exames histopatológicos os órgãos principalmente afetados foram fígado, rim e coração, sob forma de alterações degenerativas e vasculares.

Esses experimentos mostram que o coelho pode ser usado como animal experimental de pequeno porte na continuação dos estudos sobre a ação tóxica da planta, bem como nos trabalhos de isolamento e identificação de seus princípios ativos. É provável que as folhas e os frutos encerrem os mesmos princípios tóxicos.

¹ Aceito para publicação em 26 de março de 1986.

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

³ Curso de Pós-Graduação a nível de Mestrado em Patologia Animal, UFRRJ.

⁴ Departamento de Nutrição Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 47, Seropédica, RJ 23851; bolsista do CNPq (1111.5010/76).

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, intoxicação experimental por planta, *Mascagnia pubiflora*, Malpighiaceae, coelho, patologia.

Quadro 1. Experimentos em coelhos com as folhas de *Mascagnia pubiflora*, colhidas em setembro de 1984 na Faz. Iguaçu, mun. Aquidauana, Mato Grosso do Sul

Coelho		Planta administrada			Sintomas			Manifestações	Achados de necropsia
Nº (mat. reg. SAP)	Peso g	Data da administração	Quantidade g	Dose g/kg	Início após começo da administração da planta	Evolução	Morte após começo da administração da planta		
757 (23416)	3680	29.11.84	22,2	6	> 12h	?	± 20h	?	Fígado com congestão +++ Epicárdio com algumas petéquias Mucosa do estômago com algumas petéquias
762 (23499)	4020	24.5.85	16,1	4	> 15h	?	± 21h	?	Sem alterações
801	3300	2.5.85	13,2	4	-	-	-	Sem sintomas	-
806	4000	18.1.85	8	2	-	-	-	Sem sintomas	-
809	2720	1.2.85	10,9	4	-	-	-	Sem sintomas	-
822 (23498)	2580	24.5.85	15,5	6	10h24 min	2 min	10h26 min	Perdeu controle da cabeça, ficou em decúbito lateral apresentando contrações fortes por todo corpo, assumindo decúbito dorsal, deu 4 gritos e morreu. Antes durante 1h52 min quieto, apático, sonolento.	Fígado com congestão +
823 (23482)	2870	2.5.85	11,5	4	9h23 min	2 min	9h25 min	De repente começou a pular violenta e desordenadamente na gaiola, caiu de lado, apresentou respiração espaçada, deu um grito baixo e morreu. Antes durante 48 min sonolento	Sem alterações
825	3440	6.6.85	20,7	6	-	-	-	Sem sintomas	-
827 (23512)	3350	6.6.85	13,4	4	6h02 min	3 min	6h05 min	De repente começou a pular violenta e desordenadamente na gaiola, caiu em decúbito dorsal, apresentou respiração difícil, e morreu	Fígado com congestão ++ Pulmão com congestão +
828	3290	6.6.85	13,2	4	-	-	-	Sem sintomas	-
834 (23523)	2960	13.6.85	17,8	6	> 40h	?	± 45h39 min	?	Fígado externamente e ao corte com aspecto de noz-moscada Pulmão com congestão (+)
835 (23520)	2560	13.6.85	15,4	6	> 15h	?	± 20h	?	Fígado com congestão ++ Pulmão com congestão (+)
838	2720	20.6.85	10,9	4	-	-	-	Sem sintomas	-
839	2920	20.6.85	11,7	4	-	-	-	Sem sintomas	-

^a +++ Lesão acentuada, ++ moderada, + leve, (+) meio grau.

INTRODUÇÃO

Mascagnia pubiflora (Juss.) Griseb., um cipó que tem os nomes populares de "corona" ou "cipó-prata", pertencente à família Malpighiaceae, é uma das plantas tóxicas mais importantes da Região Centro-Oeste (Estado de Mato Grosso do Sul, sul do Estado de Goiás), e áreas vizinhas da Região Sudeste (Triângulo Mineiro e Estado de São Paulo) (Fernandes & Macruz 1964, Tokarnia & Döbereiner 1973, Santos et al. 1976). Os prejuízos econômicos que causa pela morte de bovinos são sentidos de maneira especial, pois a planta ocorre nos solos melhores, nos que se prestam ao plantio de capim-colonião, áreas que, geralmente com investimentos elevados, foram desmatadas; outra característica que aumenta a sua nocividade é que a planta é de difícil erradicação em virtude do seu bem desenvolvido sistema radicular.

A única espécie animal em que se sabe ocorrer a intoxicação por *M. pubiflora* sob condições naturais é a bovina, na qual foi feita a maioria dos experimentos no estudo da toxidez da planta, em que ela foi administrada por via oral. Experimentalmente a planta tem sido administrada também a coelhos e cobaios, sob forma de extratos aquosos por via gástrica (sonda) e intraperitoneal, ou como ração verde (Fernandes & Macruz 1964); infelizmente não têm sido fornecidos os detalhes desses experimentos.

O presente estudo foi realizado para verificar até que ponto o coelho é sensível à intoxicação por *M. pubiflora*, quando administrada por via intragástrica (sonda), sob forma dessecada. Esses conhecimentos são necessários para a continuação dos estudos sobre a ação tóxica da planta, como na identificação de seus princípios ativos.

MATERIAL E MÉTODOS

As folhas e os frutos de *Mascagnia pubiflora* (Juss.) Griseb., cipó da família Malpighiaceae, colhidos no município de Aquidauana, Mato Grosso do Sul, em setembro de 1984, foram, separadamente, dessecados, inicialmente à sombra em temperatura ambiente, em seguida, em estufa a 40–45°C durante 2 a 3 dias, triturados em moinho Wiley com malha 60 e finalmente conservados em vidros hermeticamente fechados com tampa de plástico, à sombra e em temperatura ambiente.

As folhas, assim preparadas, foram administradas no período de 29.11.84 a 20.6.85 a 14 coelhos, em doses únicas previamente determinadas (2 a 6 g/kg da planta dessecada, sendo a relação planta verde: planta dessecada igual a 4:1) por meio de um funil de separação adaptado a uma sonda gástrica, conforme técnica descrita anteriormente (Döbereiner et al. 1976).

Os frutos, preparados da mesma maneira, foram administrados no período de 29.11.84 a 27.6.85 a 9 coelhos, também em doses únicas previamente determinadas (0,5 a 2 g/kg dos frutos dessecados) através da mesma técnica.

Cada coelho era mantido em gaiola individual e, após a administração da planta, era observado continuamente durante as 12 horas seguintes e, após esse período, com intervalos. Nos casos de morte se fazia a necropsia complementada por coleta de material para exames histopatológicos. Este material era fixado em formal a 10%, incluído em parafina e corado pela hematoxilina-eosina (HE); fragmentos de fígado e rim de todos os coelhos, e em um adicionalmente do coração, após corte de congelação, foram tratados pelo Sudan III.

RESULTADOS

Os principais dados sobre os experimentos com *Mascagnia pubiflora* realizados em coelhos constam dos Quadros 1 e 2.

Em relação aos experimentos com as folhas verifica-se que dos 14 coelhos, que as receberam em doses que variaram de 2 a 6 g/kg, 7 morreram. Os restantes nem adoeceram. Dos 5 coelhos que receberam 6 g/kg, 4 morreram, dos 8 que receberam 4 g/kg, 3 morreram, e o único coelho que recebeu 2 g/kg, não mostrou sintomas de intoxicação. O início dos sintomas após o começo da administração da planta só pôde ser verificado em 3 dos 7 coelhos que morreram, em virtude de os 4 restantes somente terem adoecido e morrido com mais de 12 horas após o começo da administração da planta, quando não mais eram observados continuamente; nos primeiros 3 ocorreu entre 6h 02 min. e 10h 24min.; nos outros 4 coelhos ocorreu entre mais de 12h e menos de 45h 39min., após o começo da administração da planta. A evolução do quadro clínico nos 3 coelhos em que os sintomas foram vistos, foi de 2 a 3 minutos. Os sintomas principais da intoxicação pelas folhas de *M. pubiflora* observados foram os de "morte súbita". Um coelho (nº 822) de repente perdeu o controle dos movimentos da cabeça, ficou logo em decúbito lateral apresentando fortes contrações em todo corpo, deu gritos e morreu. Os outros 2 (Coelhos 823 e 827) de repente começaram a pular violenta e desordenadamente dentro da gaiola, caíram logo em seguida em decúbito lateral, apresentaram respiração difícil e morreram. Um desses coelhos (nº 822) durante 1h 52min., outro (nº 823) durante os 48 minutos anteriores a esses sintomas de "morte súbita" mostraram-se sonolentos. Os achados de necropsia mais importantes nos 7 coelhos foram no fígado, que era congesto em 4 casos (Coelhos 757, 822, 827 e 835); o fígado do coelho que sobreviveu durante mais tempo (Coelho 834) tinha externamente e ao corte aspecto de noz-moscada; havia congestão pulmonar em 3 coelhos (nºs 827, 834 e 835). Os exames histopatológicos (Quadro 3) revelaram nos 7 coelhos, em ordem de frequência, como os órgãos mais afetados o fígado, os rins e o coração. No fígado havia necrose de hepatócitos na zona intermediária do lóbulo manifestada pelo seu citoplasma mais eosinófilo e os seus núcleos com a cromatina condensada (Fig. 1) em 3 coelhos, vacuolização do citoplasma de hepatócitos com localização variada, nos 7 coelhos (pelo Sudan III, em 2 desses totalmente positivo, em um terceiro parcialmente positivo, e nos outros inteiramente negativo), congestão em 5 coelhos, dissociação dos cordões hepáticos em 6 coelhos, atrofia por compressão dos cordões hepáticos em 3 e edema dos espaços de Disse em 2 coelhos. No rim foi verificada degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos túbulos contornados distais (Fig. 4) em 2 coelhos, em um deles apenas discretamente, e esteatose de células epiteliais de túbulos uriníferos, sobretudo da medular, nos 7 coelhos. No coração foi observado afastamento entre as fibras cardíacas em 2, aumento da eosinofilia de grupos de fibras em 2 e infiltrados linfocitários em 2. Em um desses (Coelho 834), o que sobreviveu durante mais tempo, havia ainda vacuolização moderada das fibras cardíacas, com reação positiva ao Sudan III em grande parte, e proliferação de fibroblastos.

Quadro 2. Experimentos em coelhos com os frutos dessecados de *Mascagnia pubiflora*, colhidos em setembro de 1984 na Faz. Iguaçú, mun. Aquidauana, Mato Grosso do Sul

Coelho		Planta administrada			Sintomas				Manifestações	Achados de necropsia
Nº (mat. reg. SAP)	Peso g	Data da administração	Quantidade g	Dose g/kg	Início após começo da administração da planta	Evolução	Morte após começo da administração da planta			
759 (23414)	4200	29.11.84	8,4	2	2h18 min	1 min	2h19 min	Começou a gritar, caiu de lado, esticou as pernas e morreu	Fígado com congestão ++ ^a	
808	2660	01.02.85	1,33	0,5	—	—	—	Sem sintomas	—	
810 (23478)	3200	19.04.85	3,2	1	3h22 min	2 min	3h24 min	Começou a pular desordenadamente, caiu de lado, fortes movimentos de pedalagem, dispnéia, gritos baixos, respiração espaçada, morte	Fígado com congestão + Pulmão com congestão ++	
826	3040	06.06.85	1,52	0,5	—	—	—	Sem sintomas	—	
831 (23517)	2580	13.06.85	3,6	1,45	10h09 min	2 min	10h11 min	Começou a pular desordenadamente na gaiola, caiu em decúbito lateral, com respiração ofegante, espaçada, morreu	Fígado com congestão +++ Pulmão com congestão +	
832 (23519)	2740	13.06.85	5,6	2	15h	?	± 20h	?	Fígado com congestão ++ Pulmão com congestão +	
833 (23526)	2680	20.06.85	2,7	1	9h28 min	3 min	9h31 min	De repente começou a pular violenta e desordenadamente, caiu em decúbito lateral. Respiração ofegante, depois espaçada. Deu um grito e morreu	Fígado externamente e ao corte com lobulação bem perceptível Baço aumentado e ao corte com pontilhado claro fino	
840	2990	20.06.85	1,5	0,5	—	—	—	Adoeceu moderadamente: durante o dia seguinte à administração muito quieto e arripiado, mas comeu bem	—	
847	2640	27.06.85	1,32	0,5	—	—	—	Adoeceu moderadamente; durante o dia seguinte à administração não comeu quase nada	—	

^a +++ Lesão acentuada, ++ moderada, + leve, (+) meio grau.

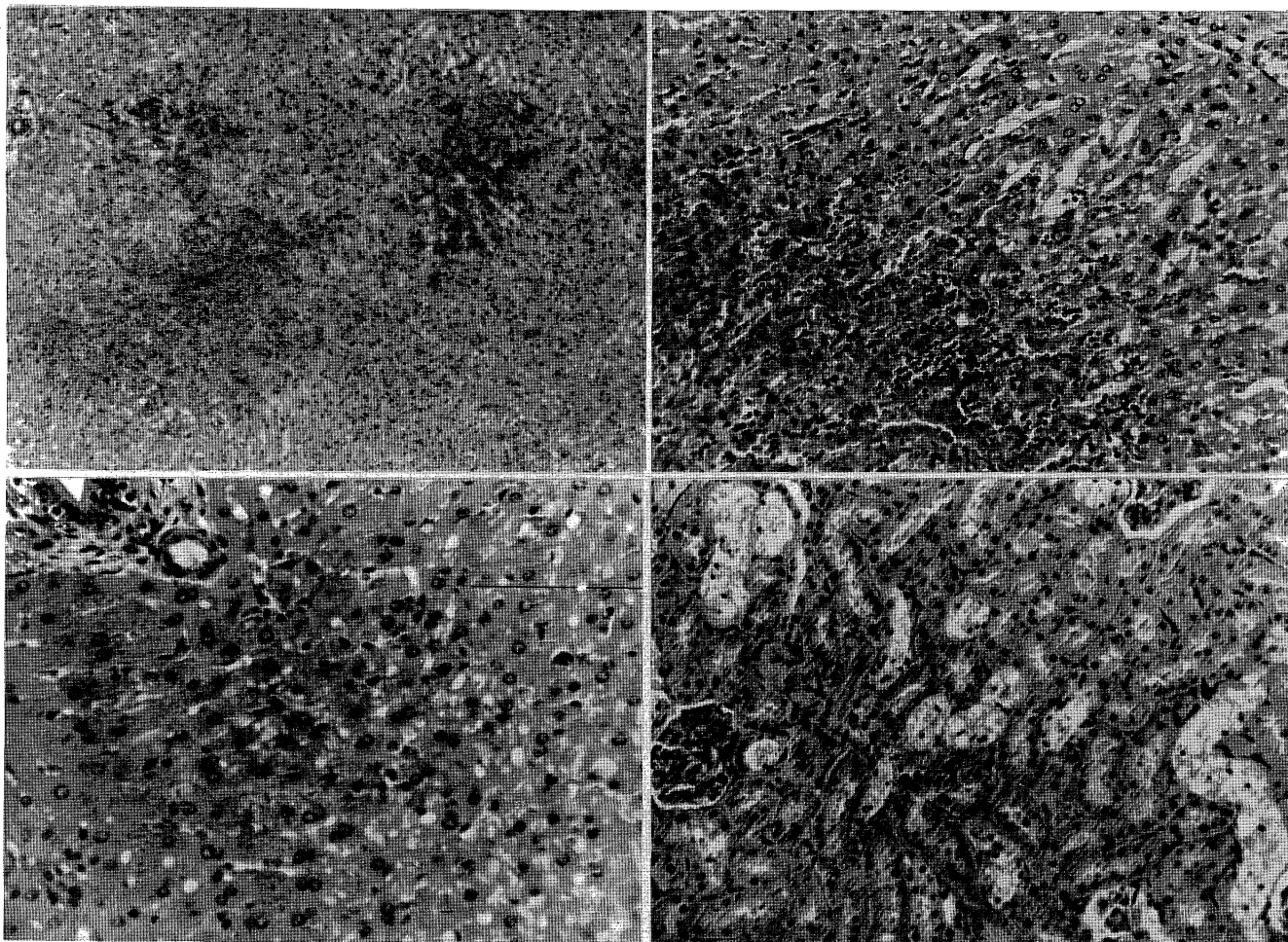


Fig. 1. Necrose na zona intermediária e congestão centrolobular hepática na intoxicação experimental pelas folhas de *Mascagnia pubiflora* (Coelho 757, SAP 23416). HE, obj. 6,3.

Fig. 2. Necrose de hepatócitos na zona intermediária do lóbulo hepático, na intoxicação experimental pelos frutos de *M. pubiflora* (Coelho 832, SAP 23519). HE, obj. 16.

Fig. 3. Vacuolização do citoplasma de hepatócitos na zona intermediária do lóbulo hepático, na intoxicação experimental pelos frutos de *M. pubiflora* (Coelho 759, SAP 23414). HE, obj. 25.

Fig. 4. Degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos túbulos contornados distais no rim, na intoxicação experimental pelas folhas de *M. pubiflora* (Coelho 757, SAP 23416). HE, obj. 16.

Em relação aos experimentos com os *frutos*, verifica-se que dos 9 coelhos, que os receberam em doses que variaram de 0,5 a 2 g/kg, 5 morreram. Morreram todos os 5 coelhos que receberam os frutos nas doses de 1, 1,45 e 2 g/kg, enquanto que dos 4 que os receberam na dose de 0,5 g/kg, nenhum morreu. O início dos sintomas após o começo da administração da planta pôde ser verificado em 4 dos 5 coelhos que morreram. Nesses ocorreu entre 2h 18min. e 10h 09min., no quinto coelho ocorreu entre mais de 15 e menos de 20 horas após o começo da administração da planta. A evolução do quadro clínico nos 4 coelhos em que os sintomas foram vistos, foi de 1 a 3 minutos. Os sintomas principais da intoxicação pelos frutos de *M. pubiflora* foram também os de "morte súbita". Dos 4 coelhos, 3 de repente começaram a pular violenta e desordenadamente na gaiola, caíram logo em seguida em decúbito lateral, tinham a respiração ofegante, 2 deles deram gritos, e morreram. O quarto coelho simplesmente de repente caiu de lado, gritando, esticou os membros e morreu. Os achados de necropsia mais fre-

quentes nos 5 coelhos foram no fígado, que em 4 era congesto, no quinto a sua lobulação era bem perceptível; em 3 havia ainda congestão pulmonar. Os exames histopatológicos (Quadro 3) nos 5 coelhos revelaram como órgão mais afetado o fígado, seguido pelos rins e coração. No fígado havia necrose de hepatócitos na zona intermediária do lóbulo manifestado pelo seu citoplasma mais eosinófilo e os seus núcleos com a cromatina condensada (Fig. 2) em 1 coelho, vacuolização do citoplasma dos hepatócitos (Fig. 3), com localização variada, em 3 coelhos (pelo Sudan III em todos eles inteiramente negativo), tumefação dos hepatócitos, na zona intermediária e no centro do lóbulo em 1 coelho, congestão em 1, dissociação dos hepatócitos em 2 e edema dos espaços de Disse em 1 coelho. No rim foi verificada degeneração hidrópico-vascular das células epiteliais dos túbulos contornados distais em 1 coelho. No coração foi observada eosinofilia de grupos de fibras cardíacas em um coelho.

Quadro 3. Achados histopatológicos na intoxicação experimental por *Mascagnia pubiflora* em coelhos

Coelho	Fígado							Rim			Coração			
	Nº (mat. reg. SAP)	Necrose (citoplasma mais eosinófilo e núcleos com cromatina condensada)	Vacuolização do citoplasma dos hepatócitos	Hepatócitos tumefeitos com citoplasma granular (Sudan III neg.)	Congestão	Dissociação dos cordões hepáticos	Atrofia compressiva dos cordões hepáticos	Edema dos espaços de Disse	Degeneração hidrópico-vacuolar das células epiteliais dos túbulos contornados distais (Sudan III neg.)	Esteatose das células epiteliais dos túbulos uriníferos da		Afastamento entre fibras	Aumento da eosinofilia de fibras	Infiltrados inflamatórios linfocitários
									Cortical	Junção cortico-medular	Medular			
<i>Intoxicação experimental pelas folhas</i>														
757 (23416)	I ^b ++c	P +	-	I + C ++(+)	++	++ (+)	-	++ (+)	++	++	+	-	-	-
762 (23499)	-	P ++ I ++ C +	-	I ++	-	-	-	-	+	++	++	+	-	-
822 (23498)	I +	P - I ++ C ++	-	-	++	-	-	(+)	-	(+)	+	-	-	-
823 (23482)	-	P - I +(+) C +	-	+	++	+	+	-	-	-	+	-	-	-
827 (23512)	-	P + I +(+) C -	-	-	+	-	-	-	-	-	+(+)	-	-	-
834 (23523)	C ++(+)	P - I ++ C -	-	I + C +	+	-	-	-	-	-	++	++ d	+	+e
835 (23520)	-	P +(+) I - C +(+)	-	I ++(+) C +	+	++	+	-	-	-	(+)	-	+	-
<i>Intoxicação experimental pelos frutos</i>														
759 (23414)	-	P - I ++ C ++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
810 (23478)	-	-	I ++ C ++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
831 (23517)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+(+)	-	-	-
832 (23519)	I ++	P - I + C +	-	I ++	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
833 (23526)	-	P +(+) I +(+) C +(+)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-

^a Sudan III totalmente positivo: Coelhos 757, 762; Sudan III positivo para a vacuolização periferilobular e negativo para a vacuolização na zona intermediária do lóbulo: Coelho 827; Sudan III inteiramente negativo: Coelhos 822, 823, 834, 835, 759, 810, 831, 832, 833.

^b P = periferilobular, I = zona intermediária do lóbulo, C = centrolobular.

^c +++ Lesão acentuada, ++ moderada, + leve, (+) meio grau.

^d Adicionalmente vacuolização de fibras cardíacas em grau moderado, em grande parte com reação positiva pelo Sudan III.

^e Adicionalmente proliferação de fibroblastos.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em nossos experimentos tanto as folhas como os frutos dessecados de *Mascagnia pubiflora*, colhidos em setembro de 1984, conservados na sombra à temperatura ambiente, e administrados entre aproximadamente 2 e 9 meses após, demonstrou possuir toxidez para o coelho. O quadro clínico, o mesmo tanto nos coelhos que receberam as folhas como nos que receberam os frutos, foi o de "morte súbita", observado também nas intoxicações experimentais em coelhos com *Palicourea marcgravii* (Peixoto et al. 1986), *Palicourea juruana* (Tokarnia & Döbereiner 1982), *Palicourea grandiflora* (Döbereiner & Tokarnia 1982), da família Rubiaceae, *Pseudocalymma elegans* (Tavares et al. 1974), *Arrabidaea bilabiata* (Döbereiner et al. 1984), *Arrabidaea japurensis* (Döbereiner & Tokarnia 1983), da família Bignoniaceae, e *Mascagnia* aff. *rigida* (Tokarnia et al. 1985). Também os achados de necropsia e as alterações histopatológicas foram os mesmos para as folhas e os frutos. À necropsia, o achado mais comum foi congestão hepática, em segundo lugar congestão pulmonar. As alterações histopatológicas principais eram do fígado, rim e coração, sob forma de alterações degenerativas e vasculares. Verificou-se que os frutos de *M. pubiflora* foram aproximadamente 6 vezes mais tóxicos que suas folhas; enquanto que doses a partir de 1 g/kg dos frutos mataram todos os coelhos, 6 g/kg das folhas mataram 4 dos 5 coelhos.

Os frutos provocaram mais rapidamente que as folhas o aparecimento dos primeiros sintomas após o começo de sua administração; no caso dos frutos, em 4 dos 5 coelhos, no caso das folhas, só em 3 dos 7 coelhos, dos que morreram, ocorreu antes de 12 horas após o começo da administração da planta. Mas essa diferença pode ter a sua explicação no fato de que no caso dos frutos a dose integral era administrada sempre de uma só vez (com nossa metodologia conseguimos administrar de cada vez 2 g/kg da planta dessecada ao coelho), enquanto que com as folhas a dose era administrada em 2 vezes (quando era de 4 g/kg) e até 3 vezes (quando era de 6 g/kg), com intervalos de aproximadamente 3 a 4 horas.

Os nossos experimentos mostram que o coelho pode ser usado como animal experimental de pequeno porte na conti-

nuação dos estudos sobre a ação tóxica da planta, bem como nos trabalhos de isolamento e identificação de seus princípios ativos.

Agradecimentos.- Ao Dr. Ludwig Busam, Instituto de Química da Escola de Medicina Veterinária de Hannover, RFA, e ao Dr. Ivan Valadão Rosa, Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Gado e de Corte, Campo Grande, MS, pela cessão do material vegetal coletado em Mato Grosso do Sul.

REFERÊNCIAS

- Döbereiner J., Peixoto P.V. & Tokarnia C.H. 1984. Intoxicação experimental por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 4(3): 89-96.
- Döbereiner J., Rezende A.M.L. & Tokarnia C.H. 1976. Intoxicação experimental por *Baccharis coridifolia* em coelhos. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.* 11:27-35.
- Döbereiner J. & Tokarnia C.H. 1982. Intoxicação experimental por *Palicourea grandiflora* (Rubiaceae) em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 2(3): 121-124.
- Döbereiner J. & Tokarnia C.H. 1983. Intoxicação experimental por *Arrabidaea japurensis* (Bignoniaceae) em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 3(3): 95-97.
- Fernandes N.S. & Macruz R. 1964. Toxicidade da "corona", *Mascagnia pubiflora* (Juss.) Griseb. (Malpighiaceae). *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 31(1): 1-4.
- Peixoto P.V., Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1986. Intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii* em coelhos. (Trabalho em preparação)
- Santos F.C.C., Fischer P. & Jardim E.C. 1976. Intoxicação experimental em bovinos por "timbó" *Mascagnia pubiflora*. *Anais da Escola de Agronomia e Veterinária da Universidade Federal de Goiás* 6(1): 97-103.
- Tavares M.I., Rezende A.M.L. & Döbereiner J. 1974. Intoxicação experimental por *Pseudocalymma elegans* em coelhos e cobaias. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.*, 9:91-94.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1973. Intoxicação por *Mascagnia pubiflora* em bovinos no Estado de Mato Grosso. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.*, 8: 61-68.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1982. Intoxicação experimental por *Palicourea juruana* (Rubiaceae) em bovinos e coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 2(1): 17-26.
- Tokarnia C.H., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 1985. Intoxicação experimental por *Mascagnia* aff. *rigida* (Malpighiaceae) em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 5(4): 121-128.

ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E ENDOTÓXICAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE LESÕES PERIDENTÁRIAS DA "CARA INCHADA" DOS BOVINOS¹

IVERALDO DOS SANTOS DUTRA², MASAMITSU KANOE³ e HANS BLOBEL⁴

ABSTRACT.- Dutra I.S., Kanoe M. & Blobel H. 1986. [Enzymatic and endotoxic activities of bacteria isolated from periodontal lesions of calves with "Cara inchada".] Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 6 (2): 59-63. Institut für Bakteriologie und Immunologie, Justus Liebig-Universität, Frankfurter Str. 107, D-6300 Giessen, W.-Germany.

Bacteria isolated from periodontal lesions of calves with "cara inchada" were examined for enzymatic and endotoxic activities. Black-pigmented cultures of *Bacteroides* produced deoxyribonuclease, collagenase, chondroitin sulfatase, fibrinolysin, gelatinase, hyaluronidase, lipase and protease. Trypsin-like proteolytic activities were demonstrated in cultures of black-pigmented asaccharolytic *Bacteroides* that were also high producer of collagenase. *Actinomyces israelii*, *A. pyogenes* and *Fusobacterium nucleatum* showed weak production of hydrolytic enzymes. Biological activities of lipopolysaccharides extracted from *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides spp.* and *F. nucleatum* were examined by the ability to produce a Shwarzman-reaction in rabbits. Endotoxic lipopolysaccharides from *F. nucleatum* had higher biological activities than those from *Bacteroides*. These findings suggest a possible role of the bacterial enzymes and endotoxins in the development of periodontal lesions in young cattle.

SINOPSE.- Estudos foram realizados para determinar as atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias de bezerros com "cara inchada". Amostras "pigmentadas" de *Bacteroides* hidrolisaram o maior número de substratos, produzindo desoxirribonuclease, colagenase, sulfato de condroitinase, fibrinolissina, gelatinase, hialuronidase, lipase e protease. Atividade proteolítica semelhante à da tripsina foi observada nas amostras assacarolíticas de *Bacteroides*, que foram também mais ativas na produção de colagenase. *Actinomyces israelii*, *Actinomyces pyogenes* e *Fusobacterium nucleatum* foram pouco ativos na produção de enzimas hidrolíticas. Atividade biológica de lipopolissacarídeos extraídos de *Bacteroides spp.*, *B. melaninogenicus* e *F. nucleatum* foi testada pela capacidade de produção da reação dérmica de Shwarzman em coelhos. Endotoxina de *F. nucleatum* foi mais ativa, quando comparada com a de *Bacteroides*. Os resultados sugerem uma possível participação de enzimas e endotoxinas bacterianas no desenvolvimento das lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos.

INTRODUÇÃO

"Cara inchada" (CI) é uma doença peridentária que acomete bezerros mantidos em determinadas áreas de pastagens recém-formadas, nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil. A doença caracteriza-se por uma lesão peridentária progressiva, uni- ou bilateral, tendendo para uma periostite crônica ossificante, com afrouxamento e perda dos dentes premolares e molares, e abaulamento ósseo maxilar (Döbereiner et al. 1974). Em casos avançados os animais apresentam um mau estado nutricional, causado pela incapacidade em se alimentar, e podem morrer por inanição. A doença pode incidir mais que 60% dos animais em fase de dentição, nos primeiros anos após a abertura de pastos novos em áreas de derrubada, ou pastagens cultivadas do cerrado, com tendência a diminuir no decorrer do tempo.

A etiologia da CI é desconhecida. Fatores alimentares e nutricionais tem sido citados como possíveis causas determinantes no seu aparecimento (Döbereiner et al. 1975, Döbereiner et al. 1976, Rosa et al. 1976). As lesões da CI não ocorrem, no entanto, sem a presença de determinadas bactérias anaeróbias Gram-negativas. Recentemente Blobel et al. (1984), realizando estudos bacteriológicos das lesões peridentárias em 23 bezerros, isolaram *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides bivius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces (Corynebacterium) pyogenes* e *Actinomyces israelii*. Embora repetidas inoculações intra-gengivais de *A. pyogenes* e *B. melaninogenicus* em bezerros não provocaram lesões semelhantes à da doença, não pode ser descartado uma possível participação de bactérias no seu desenvolvimento.

O acúmulo e produção de enzimas, toxinas e outros produtos metabólicos por bactérias anaeróbias Gram-negativas no

1 Aceito para publicação em 30 de abril de 1986.

Trabalho realizado com o apoio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)/Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas (IICA) e da Sociedade Alemã de Pesquisa (Deutsche Forschungsgemeinschaft), Bonn, República Federal da Alemanha.

2 Bolsista da Embrapa.

3 Instituto de Microbiologia Veterinária, Universidade Yamaguchi, Yoshida, Japão.

4 Instituto de Bacteriologia e Imunologia, Universidade Justus Liebig, Frankfurter Str. 107, D-6300 Giessen, RFA.

sulco gengival são considerados fatores primários importantes na etiologia de doença peridentária no homem (Löe et al. 1965, Ellinson 1970, Slots 1982) e nos animais (Lindhe et al. 1973, Slots & Hausmann 1979). Estas bactérias não invadem, de uma maneira geral, o tecido peridentário, mas elaboram uma série de produtos que podem participar direta-ou indiretamente na destruição de tecidos (McDonald et al. 1960, Socransky 1970, Page & Schroeder 1976, Slots & Genco 1984).

O propósito deste trabalho foi o de verificar a produção "in vitro" de enzimas hidrolíticas pelas principais espécies de bactérias isoladas de lesões peridentárias da CI, assim como a atividade biológica de endotoxinas extraídas das bactérias anaeróbias Gram-negativas.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias

As amostras de bactérias foram isoladas de lesões peridentárias de acordo com a metodologia descrita por Blobel et al. (1984). Biópsias das lesões de 5 bezerros, com CI, mantidas em N₂ líquido, foram plaqueadas diretamente em meio de cultura CDC enriquecido com hemina (5 mg/ml), vitamina K (0,5 mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Os cultivos foram examinados após 5-7 dias de incubação a 37°C, quando mantidos em anaerobiose (Gas Pak, Becton Dickinson, Cockeysville, Maryland, USA), e de 2-3 dias quando em microaerobiose. As colônias isoladas dos cultivos primários foram mantidas como culturas puras através de repetidos subcultivos semanais. A identificação foi feita considerando-se as características apresentadas pela coloração de Gram, morfologia, crescimento em aerobiose e anaerobiose e reações bioquímicas (API 20 A, API-System S.A., Montalieu, Vercieu, França), de acordo com os critérios descritos por Holdeman et al. (1977). As amostras de *Actinomyces* foram identificadas segundo Buchanan & Gibbons (1974) e Hartwig (1980).

Testes enzimáticos

As atividades enzimáticas determinadas no presente estudo foram qualitativas. O teste para verificar a produção de desoxiribonuclease (DNase) foi realizado segundo Porschen & Sonntag (1974). Bactérias foram plaqueadas em DNase-agar⁵ e, após o período de incubação, cerca de 3 ml de uma solução 1 N de HCl foram pipetados uniformemente na superfície do meio de cultura. Produção de DNase resulta numa hidrólise do DNA em frações nucleotídicas, que não são precipitadas pelo HCl, formando-se assim uma zona clara em torno das colônias.

Os testes para produção de sulfato de condroitinase e hialuronidase foram realizados pelo crescimento das bactérias em BHI-agar⁶, contendo um ou outro substrato (Smith & Willet 1968). Ácido hialurônico⁷ e sulfato de condroitina⁷ foram incorporados ao agar numa concentração de 400 mg/ml. A precipitação dos mucopolissacarídeos intactos foi feita com uma solução 2 N de ácido acético.

O método utilizado na detecção de fibrinolizina foi o descrito por Hentschel & Blobel (1968). Fibrinogênio⁸ foi acrescentado numa concentração de 3 mg/ml em Tryptic soy-agar⁹. Atividade fibrinolítica foi caracterizada pela formação de um halo claro em torno das colônias, após a incubação.

Gelatinase e lipase foram determinadas, respectivamente, pela liquefação da gelatina e pela desintegração de tributirina contida em Tributirina-agar⁵ (Holdeman et al. 1977). Protease foi determinada em Heart Infusion-agar⁹ contendo 1% de caseinato de sódio (Wilkström et al. 1981). Para determinação da atividade proteolítica semelhante à da tripsina foi utilizado BANA⁷ (N-Benzoyl-DL-Arginine-2-Naphtylamide) como substrato (Laughon et al. 1982). De acordo com a metodologia descrita, este teste foi realizado em aerobiose e com período de incubação de 18 horas.

Quando bactérias anaeróbias foram testadas para as atividades enzimáticas acima descritas, as placas foram mantidas em anaerobiose por 5 dias a 37°C. As amostras de *A. pyogenes* foram incubadas 72 horas em

microaerobiose (37°C). Todas as amostras foram testadas em duplicatas; e *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.* e *Clostridium spp.*, pertencentes à coleção do Instituto de Bacteriologia e Imunologia, Giessen, serviram como controles.

Atividade collagenolítica foi determinada preliminarmente, em todas as amostras isoladas, pela inoculação das bactérias em 10 ml de Trypticase-yeast extract⁹ (TYE) contendo 10 mg de colágeno⁷ (tipo I) insolúvel (Mayrand & Grenier 1985). Após 14 dias de incubação em anaerobiose, o conteúdo de hidroxiprolina no sobrenadante foi determinado segundo Mitoma et al. (1959). As amostras positivas foram recultivadas em TYE e submetidas a um processo de extração do componente bacteriano responsável pela atividade enzimática, de acordo com a metodologia descrita por Hausmann & Kaufman (1969). Placas contendo colágeno⁷ (tipo III) como substrato foram preparadas segundo Wellish et al. (1984); e a especificidade do teste foi confirmada com tripsina⁷ (50 mcg/ml). Colagenase de *Clostridium histolyticum*⁷ (100 mcg/ml) foi utilizada como controle positivo. Liquefação do colágeno após 3 horas de incubação a 37°C foi considerada como reação inespecífica.

Endotoxinas

Lipopolissacarídeos (LPS) foram extraídos de *Bacteroides spp.*, *B. melaninogenicus* e *F. nucleatum* segundo o método de extração por fenol e água (Westphal et al. 1952) modificado por Sasaki (1979). Foram utilizadas duas amostras de cada espécie de bactéria, escolhidas ao acaso. Para o teste biológico, 5 mg de LPS foi dissolvido em 2,5 ml de uma solução salina isotônica (0,85% NaCl) e sonificado por 2 minutos a 0°C para homogeneização. Diluições das suspensões de LPS (1 mcg - 1000 mcg em 0,5 ml de salina) foram inoculados via intra-dérmica na linha mediana do abdômen de coelhos brancos com pesos variando entre 1,5 e 2,0 kg. Após 24 horas das injeções preparatórias, os LPS homólogos (100 mcg/kg) foram inoculados via intravenosa, para provocação da reação dérmica de Shwarzman. Os controles foram feitos com inoculação intra-dérmica de solução salina. As leituras foram realizadas 4, 7 e 24 horas após as injeções provocativas.

RESULTADOS

Foram isoladas das lesões peridentárias de 5 bezerros com CI um total de 58 amostras de bactérias pertencentes aos gêneros *Actinomyces*, *Bacteroides* e *Fusobacterium*. Todas as 31 culturas de *Bacteroides* isoladas formaram colônias pigmentadas de preto após 5-7 dias de incubação em anaerobiose e foram classificadas, na sua maioria (18), como *Bacteroides melaninogenicus*. As 13 amostras pertencentes ao grupo melaninogenico, mas que não fermentaram nenhum dos açúcares testados nas reações bioquímicas, foram denominadas *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium nucleatum* (9 amostras), *Actinomyces israelii* (8) e *Actinomyces pyogenes* (10) ocorreram em todas as lesões examinadas, mas em número menor que bactérias do gênero *Bacteroides*.

Os resultados dos testes enzimáticos estão resumidos no Quadro 1. As atividades enzimáticas que ocorreram com maior frequência nas amostras de bactérias testadas foram DNase e protease. Com exceção do BANA (tripsina), todos os outros substratos foram hidrolisados por no mínimo duas das bactérias presentes nas lesões.

5 Fa. BBL Microbiology Systems, Cockeysville, USA.

6 Fa. Merck, Darmstadt, RFA.

7 Fa. Sigma, St. Louis, USA.

8 Fa. Deutsche Kabi, München, RFA.

9 Fa. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

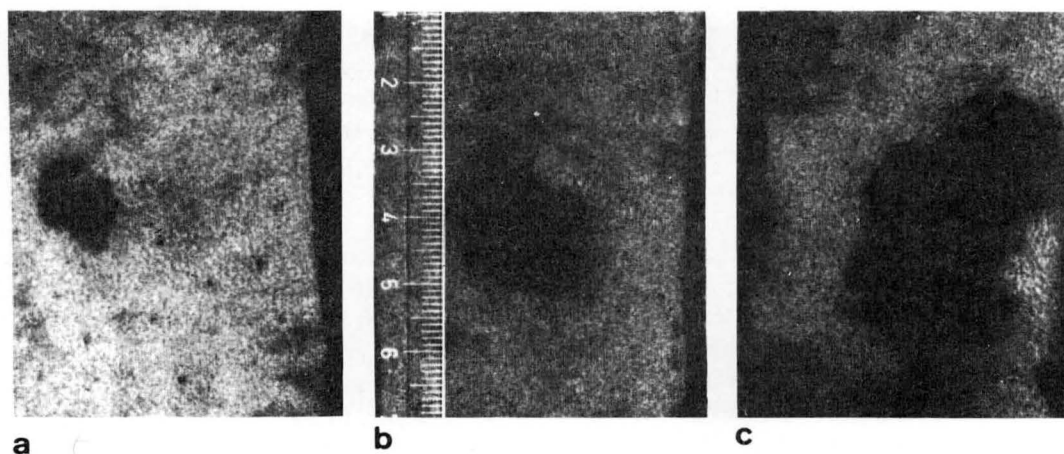


Fig. 1. Reação dérmica de Shwarzman em coelho produzida por LPS de *Fusobacterium nucleatum*. As injeções preparatórias foram de (a) 10, (b) 100 e (c) 200 mcg de endotoxina em volumes de 0,5 ml de salina. Áreas de necrose hemorrágica desenvolveram 7 horas após a injeção provocativa de endotoxina (100 mcg/kg).

Quadro 1. Atividades enzimáticas de bactérias isoladas das lesões peridentárias de bovinos com "cara inchada"

Bactéria	Amostras examinadas	Número de amostras positivas								
		DNase	COL	CON	FIB	GEL	HIA	LIP	PRO	TRI ^(a)
<i>Actinomyces israelii</i>	8	2	0	0	0	0	0	5	4	0
<i>Actinomyces pyogenes</i>	10	10	0	1	0	0	0	0	6	0
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	18	15	3	16	12	14	18	3	18	0
<i>Bacteroides spp.</i>	13	13	10	13	10	8	13	0	13	13
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	9	8	0	0	7	0	0	6	0	0

(a) Abreviaturas: DNase (Desoxiribonuclease), COL (Colagenase), CON (Sulfato de Condroitinase), FIB (Fibrinolísina), GEL (Gelatinase), HIA (Hialuronidase), LIP (Lipase), PRO (Protease), TRI (Tripsina).

Quadro 2. Reação de Shwarzman em coelhos, provocada por LPS isolados das bactérias anaeróbias Gram-negativas

Bactéria	Endotoxina ^(a) (mcg)	Tempo ^(b) (h)
<i>Bacteroides spp.</i>	(A) 100	24
	(B) 100	24
<i>B. melaninogenicus</i>	(A) 200	24
	(B) 400	24
<i>F. nucleatum</i>	(A) 10	7
	(B) 10	7

(a) Dose preparatória mínima, necessária para provocar necrose hemorrágica.

(b) Aparecimento da reação após a aplicação da dose provocativa.

Enquanto colagenase, gelatinase, hialuronidase e tripsina foram produzidas somente pelas amostras de *Bacteroides*, lipase foi mais frequentemente observada em *A. israelii* e *F. nucleatum*. *Bacteroides spp.* e *B. melaninogenicus* hidrolisaram o maior número de substratos. As amostras de *Bacteroides spp.* foram as únicas que apresentaram atividade proteolítica semelhante à da tripsina. *A. israelii*, *A. pyogenes* e *F. nucleatum* foram, de uma maneira geral, pouco ativos na hidrólise dos substratos testados.

A propriedade endotóxica das bactérias anaeróbias Gram-negativas foi determinada através da reação dérmica de Shwarzman em coelhos. Todas as preparações de LPS extraídos das amostras de *Bacteroides spp.*, *B. melaninogenicus* e *F. nucleatum* possuíram atividade biológica característica de endotoxina. Variações foram observadas, no entanto, quanto às doses preparatórias mínimas, necessárias para provocação de necrose hemorrágica, e tempo de aparecimento das lesões (Quadro 2). Endotoxina de *F. nucleatum* apresentou alta atividade biológica quando comparada com as de *Bacteroides*. Doses preparatórias de 10 mcg foram suficientes para provocar a reação de Shwarzman (Fig. 1).

DISCUSSÃO

No presente estudo foram demonstradas atividades enzimáticas e endotóxicas de microorganismos isolados de lesões peridentárias de bezerros com CI. A predominância de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Actinomyces* nas lesões da doença (Blöbel et al. 1984) e os resultados obtidos neste trabalho, permitem considerações sobre uma possível participação de microorganismos no desenvolvimento das lesões peridentárias. Estes gêneros de bactérias são impor-

tantes constituintes da microflora associada com doença peridantária no homem (Moore et al. 1982, Marsh & Martin 1984) e nos animais (Slots & Hausmann 1979, Syed et al. 1980).

Espécies de *Bacteroides* que formam colônias pigmentadas de preto em presença de hemina crescem massivamente nos cultivos diretos das lesões da CI. Enquanto a identificação das amostras sacarolíticas (*B. melaninogenicus*) pode ser feita por métodos convencionais, o mesmo não ocorreu com as amostras assacarolíticas. A atividade enzimática pode ser, no entanto, de interesse na sua identificação. Bactérias pertencentes a este grupo (assacarolítico), oriundas da placa subgingival de homem e que possuem atividade enzimática semelhante à da tripsina, são atualmente classificadas como *B. gingivalis* (Laughon et al. 1982). Embora todas as 13 amostras de *Bacteroides spp.* isolados possuam esta atividade proteolítica, a sua exata identificação permaneceu incerta devido à limitada informação taxonômica. Estudos adicionais podem ser de interesse na determinação das espécies "pigmentadas" de *Bacteroides* presentes nas lesões da CI; as diferenças entre as espécies não são apenas metabólicas, sorológicas e genéticas, mas sobretudo de patogenicidade (Mayrand et al. 1980).

A produção de enzimas hidrolíticas e outros produtos tóxicos por *Bacteroides* tem sido considerada como um dos fatores de virulência em doença peridantária (Slots & Genco 1984). Utilizando-se de métodos qualitativos e substratos específicos, as atividades enzimáticas das amostras isoladas foram determinadas. Os gêneros de bactérias isoladas das lesões da hidrolisaram pelo menos três dos nove substratos testados. *Bacteroides spp.* e *B. melaninogenicus* foram as amostras mais ativas.

A presença de atividade colagenolítica em amostras de *Bacteroides* pode ser de significado no aparecimento das lesões iniciais da CI. Colágeno é o maior constituinte do periodôncio e sua massiva destruição é o principal achado no estágio inicial de doença peridantária (Page & Schroeder 1976). Embora Golub et al. (1976) demonstrassem que a colagenase presente no fluido gengival de lesões peridantárias (no homem) é oriunda do próprio organismo, a possibilidade da participação de colagenase bacteriana não pode ser descartada. Aproximadamente 80% das amostras de *Bacteroides spp.* (assacarolíticos) testados e 16% de *B. melaninogenicus* apresentaram atividade colagenolítica. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Mayrand & Grenier (1985), que também observaram um maior número de atividade colagenolítica nas amostras assacarolíticas de *Bacteroides*.

A atividade proteolítica semelhante à tripsina nas amostras de *Bacteroides spp.* sugere que esta enzima possa participar indiretamente na destruição de tecidos observada na doença peridantária de bezerros. Estudos tem demonstrado que tripsina pode ativar colagenase latente do tecido gengival, pela destruição dos inibidores desta enzima presentes normalmente no soro (Birkendal-Hansen et al. 1975).

Outras enzimas histolíticas, específicas para diferentes constituintes de tecidos, também foram demonstradas. Protease, DNase e fibrinolisinase ocorrem principalmente no gênero *Bacteroides*, que foram pouco ativos somente na hidrólise da tributirina (lipase). A maioria das amostras deste gênero hidrolisaram também os ácidos mucopolissacarídeos testados. Os resultados destes testes enzimáticos estão de acordo com trabalhos de outros autores (Rudek & Haque 1976, Steffen & Hentges 1981, Dahlen et al. 1984).

De acordo com a metodologia descrita por Sasaki (1979) foi possível a extração de endotoxinas de *Fusobacterium* e *Bacteroides*. A demonstração da atividade biológica foi realizada na pele de coelhos devido à facilidade na interpretação dos resultados. Embora o tecido gengival seja mais susceptível que a pele, na provocação da necrose hemorrágica em coelhos, as manifestações gerais e histológicas seguintes à aplicação de endotoxinas são semelhantes em ambos os tecidos (Mergenhausen et al. 1961. Os LPS extraídos das amostras de *Fusobacterium* foram biologicamente muito mais ativos que os de *Bacteroides*. A baixa atividade biológica da endotoxina de *Bacteroides*, isolados da cavidade oral do homem, tem sido descrita por Hofstad (1970) e é atribuída à ausência de 2-queto-3-deoxi-otonato (Hofstad 1974).

Hausmann (1974) tem sugerido que endotoxinas de bactérias anaeróbias Gram-negativas possam ser responsáveis pela intensa reabsorção óssea observada em algumas formas de doença peridantária no homem e nos animais. LPS isolados de *B. melaninogenicus* e *F. nucleatum* estimulam a reabsorção óssea em culturas de tecidos (Hausmann et al. 1970, Sveen & Skaug 1980). A exposição de epitélio do sulco gengival à permanente presença de bactérias, pode resultar na penetração de endotoxinas com propriedades biológicas e causar as alterações ósseas observadas na CI.

Os resultados do presente estudo indicam uma possível participação primária de bactérias no desenvolvimento das lesões peridantárias da CI. Estudos complementares, considerando os aspectos bacteriológicos da doença, são de interesse no esclarecimento da sua etiologia.

REFERÊNCIAS

- Birkendal-Hansen, H., Cobb, C.M., Taylor, R.E. & Fullmer, H.M. 1975. Trypsin activation of latent collagenase from several mammalian sources. Scand. J. Dent. Res. 83: 302-305.
- Blobel, H., Döbereiner, J., Lima, F.G.F. & Rosa, I.V. 1984. Bacterial isolations from "Cara inchada"-lesions of cattle. Pesq. Vet. Bras. 4 (2): 73-77.
- Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (ed.) 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland.
- Dahlen, G., Wilkström, M. & Möller, A. 1984. Production of histolytic enzymes by a combination of oral bacteria with known pathogenicity. J. Dent. Res. 62: 1041-1044.
- Döbereiner, J., Inada, T. & Tokarnia, C.H. 1974. "Cara inchada", doença peridantária em bovinos. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet., 9: 63-85.
- Döbereiner, J., Chaves, J.A., Rosa I.V. & Houser, R.H. 1975. Efeito da transferência de bovinos com "cara inchada" (doença peridantária) para pastos de região indene. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet., 10: 90-103.
- Döbereiner, J., Rosa I.V. & Lazzari A.A. 1976. "Cara inchada" (doença peridantária) em bezerros mantidos em pastos de *Panicum maximum*. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet., 11: 43-47.
- Ellison, S.A. 1970. Oral bacteria and periodontal disease. J. Dent. Res. 49: 198-202.

- Golub, L.M., Siegel, K., Ramamurth N.S. & Mandel I.D. 1976. Some characteristics of collagenase activity in gingival crevicular fluid and its relationship to gingival diseases in humans. *J. Dent. Res.* 55: 1049-1057.
- Hartwig, H. 1980. Corynebakterien, p. 279-343. In: Blobel, H. & Schliesser, Th. (ed): *Handbuch der bakteriellen Infektion bei Tieren*, Bd. 2, Fischer Verlag Stuttgart.
- Hausmann, E. 1974. Potential pathway for bone resorption in human periodontal disease. *J. Periodontol.* 45: 338-343.
- Hausmann, E. & Kaufman, E. 1969. Collagenase activity in a particulate fraction from *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochim. Biophys. Acta* 194: 612-615.
- Hausmann E., Raisz, L.G. & Miller W.A. 1970. Endotoxin stimulation of bone resorption in tissue cultures. *Science* 168: 862-864.
- Hentschel, G. & Blobel H. 1968. Untersuchung über Staphylokokken-Fibrinolysin. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig.* 206 (2): 193-201.
- Hofstad, T. 1970. Biological activities of endotoxin from *Bacteroides melaninogenicus*. *Arch. Oral. Biol.* 15: 343-349.
- Hofstad, T. 1974. The distribution of heptose and 2-keto-3-deoxyoctonate in Bacteroidaceae. *J. Gen. Microbiol.* 85: 314-320.
- Holdeman I.V., Cato E.P. & Moore W.E.C. 1977. *Anaerobe laboratory manual*, 4th ed. VPI Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- Laughon B.E., Syed S.A. & Loesche W.J. 1982. Rapid identification of *Bacteroides gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* 15: 345-346.
- Lindhe J., Hamp S.E. & Løe, H. 1973. Experimental periodontitis in the beagle dog. *J. Periodont. Res.* 8: 1-10.
- Løe, H., Theilade, E. & Jensen, S.B. 1965. Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.* 36: 177-187.
- MacDonald, J.B., Gibbons, R.J. & Socransky, S.S. 1960. Bacterial mechanisms in periodontal disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85: 467-478.
- Marsh, P.D. & Martin, M.V. (ed). 1984. *Oral microbiology*. 2nd ed. Am. Soc. Microbiol., Washington.
- Mayrand, D. & Grenier, D. 1985. Detection of collagenase activity in oral bacteria. *Can. J. Microbiol.* 31:134-138.
- Mayrand, D., McBride, B.C., Edwards, T. & Jensen, S. 1980. Characterization of *Bacteroides asacharolyticus* and *B. melaninogenicus* oral isolates. *Can. J. Microbiol.* 26: 1178-1183.
- Mergenhagen, S.E., Hampp, E.G. & Scherp, H.W. 1961. Preparation and biological activities of endotoxins from oral bacteria. *J. Infect. Dis.* 108: 304-310.
- Mitoma, C., Smith, T.E., Davidson, J.D., Udenfriend, J., Da Costa, F.M. & Sjoerdsma, A. 1959. Improvements in methods for measuring hydroxyproline. *J. Lab. Clin. Med.* 53: 970-976.
- Moore W.E.C., Holdeman L.V., Smibert R.M., Good I.J., Burmeister J.A., Palcanis K.G & Raney R.R. 1982. Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect. Immun.* 38: 651-667.
- Page R.C. & Schroeder H.E. 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. *Lab. Invest.* 33: 235-249.
- Porschen, R.K. & Sonntag, S. 1974. Extracellular deoxyribonuclease production by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.* 27: 1031-1033.
- Rosa, I.V., Carvalho, J.C., Houser, R.H. & Döbereiner, J. 1976. Influência de ração balanceada sobre a "cara inchada" (doença periodontária) de bezerros. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.*, 11: 59-63.
- Rudek, W. & Haque, R. 1976. Extracellular enzymes of the genus *Bacteroides*. *J. Clin. Microbiol.* 4: 458-460.
- Sazaki S. 1979. Biological activity of lipopolysaccharides isolated from bacteria in human periodontal lesions. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 20: 159-174.
- Slots J. 1982. Importance of black-pigment *Bacteroides* in human periodontal disease, p. 27-45. In: Genco R.J. & Mergenhagen S.E. (ed). *Host-parasite interactions in periodontal disease*. Am. Soc. Microbiol., Washington.
- Slots, J. & Genco, R.J. 1984. Black-pigmented *Bacteroides species*, *Capnocytophaga species* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J. Dent. Res.* 63: 412-421.
- Slots J. & Hausmann E. 1979. Longitudinal study of experimentally induced periodontal disease in *Macaca arctoides*. Relationship between microflora and alveolar bone loss. *Infect. Immun.* 23: 260-269.
- Smith R.F. & Willet N.P. 1968. Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin-sulfatase-producing microorganisms. *Appl. Microbiol.* 16: 1434-1436.
- Socransky, S.S. 1970. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. Dent. Res.* 49: 203-222.
- Steffen, E.K. & Hentges, D.J. 1981. Hydrolytic enzymes of anaerobic bacteria isolated from human infections. *J. Clin. Microbiol.* 14: 153-156.
- Sveen, K. & Skaug, N. 1980. Bone resorption stimulating by lipopolysaccharides from *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Veillonella*, and by lipid A and the polysaccharide part of *Fusobacterium* lipopolysaccharide. *Scand. J. Dent. Res.* 88: 535-542.
- Syed, S.A., Svanberg, M. & Svanberg, G.K. 1980. The predominant cultivable dental plaque flora of beagle dogs with gingivitis. *J. Periodont. Res.* 15: 123-136.
- Wellish, G., Cohen, E., Cahane, Z. & Horowitz, J. 1984. Simple method for collagenase determination in 38 *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Clin. Microbiol.* 20: 1020-1021.
- Westphal O., Luderitz O. & Bister F. 1952. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturf.* 7b: 148-155.
- Wilkström M., Elwing H. & Linde A. 1981. Determination of proteolytic activity: a sensitive and simple assay utilizing adsorbed to a plastic surface and radial diffusion in gel. *Anal. Biochem.* 118: 240-246.