

ISSN 0100-736X

Volume 7 Número 2
Abr/Jun 1987

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Brazilian Journal of Veterinary Research



Revista do Colégio Brasileiro de Patologia Animal

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, é revista bilíngüe 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. 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, 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, Laerte Grisi, Eberhard Grunert, Jorge Almeida Guimarães, Gerhard Habermehl, Ernesto Hofer, Michael R. Honer, Mario Mariano, Anton Mayr, Francisco Megale, Hans Merkt, Gonzalo E. Moya, Ronaldo Reis, Carlos H. Romero, Ivan B. Machado Sampaio, Hermann G. Schatzmayr, L.-Cl. Schulz.

A correspondência referente à publicação de trabalhos e a outros assuntos técnico-científicos editoriais deve ser endereçada ao (*All editorial communications, including typescripts, should be addressed to*, Dr. Jürgen Döbereiner, Embrapa-UAPNPSA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851 (Brazil); tels.: (021) 782-1081 e 782-1082.

Este número é publicado e distribuído com o apoio concedido pelo
Programa MCT/CNPq/Finep, da Embrapa e UFRRJ

Figura da capa: Na brotação dos pastos nos meses de agosto a outubro sobretudo após queimadas, quando há escassez de pastagem, a planta tóxica *Vernonia mollissima* é a causa de mortandades em bovinos nos municípios de Bela Vista e Caracol, Mato Grosso do Sul. (Gava et al., p. 33)

Cover illustration: During the sprouting of pastures from the months of August to October, especially after burning when there is a scarcity of pasture, the toxic plant *Vernonia mollissima* is the cause of deaths in cattle in the districts of Bela Vista and Caracol in the State of Mato Grosso do Sul. (Gava et al., p. 33)

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)

Publicidade: NEOTÉCNICA Editora Ltda., Av. Passos 115, s/501
20051 – Rio de Janeiro, RJ (Tel.: 263-7561)

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 7

Abril/Junho 1987

Número 2

SUMÁRIO

Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. <i>C.H. Langenegger, J. Langenegger & S.G. Costa</i>	27-32
Intoxicação experimental por <i>Vernonia mollissima</i> (Compositae) em ovinos e bovinos. <i>A. Gava, P.V. Peixoto & C.H. Tokarnia</i>	33-41
Comparação entre os testes de imunoeletrosmoforese, soroneutralização e microimunodifusão no diagnóstico sorológico da doença de Aujeszky. <i>P.M. Roehe, H.E.A. Bruchmann, L.G. Oliveira, E.V. Bangel, R.M. Martins & T. Vidor</i>	43-46
Paralysis in <i>Gallus gallus</i> and <i>Cairina moschata</i> induced by larvae of <i>Argas</i> (<i>Persicargas</i>) <i>miniatus</i> . [Paralisia em <i>Gallus gallus</i> e <i>Cairina moschata</i> induzida por larvas de <i>Argas</i> (<i>Persicargas</i>) <i>miniatus</i> .] <i>F.E.P. Magalhães, C.L. Massard & N.M. Serra Freire</i>	47-49
Intoxicação por <i>Senecio</i> spp. (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. <i>M.C. Méndez, F. Riet-Correa & A.L. Schild</i>	51-56
Resumos 11-21	v-vi
Tópico: Diagnóstico alérgico da tuberculose bovina	vii-viii

CONTENTS

An allergen for the diagnosis of caseous lymphadenitis in goats. <i>C.H. Langenegger, J. Langenegger & S.G. Costa</i>	27-32
Experimental poisoning by <i>Vernonia mollissima</i> (Compositae) in sheep and cattle. <i>A. Gava, P.V. Peixoto & C.H. Tokarnia</i>	33-41
Comparison of imunoeletrosmophoresis, serum neutralization and immunodiffusion in the serological diagnosis of Aujeszky's disease. <i>P.M. Roehe, H.E.A. Bruchmann, L.G. Oliveira, E.V. Bangel, R.M. Martins & T. Vidor</i>	43-46
Paralysis in <i>Gallus gallus</i> and <i>Cairina moschata</i> induced by larvae of <i>Argas</i> (<i>Persicargas</i>) <i>miniatus</i> . <i>F.E.P. Magalhães, C.L. Massard & N.M. Serra Freire</i>	47-49
Poisoning by <i>Senecio</i> spp. (Compositae) in cattle in southern Brazil. <i>M.C. Méndez, F. Riet-Correa & A.L. Schild</i>	51-56

ISSN 0100736X

Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro, v.7, n.2, p. 27-56, abr./jun. 1987

39ª Região Anual-Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Brasília, 12 a 18.7.1987
(Secretaria Geral: Av. Pedroso de Moraes 1512, São Paulo, SP 05420)

VII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, 20 a 24.7.1987
(Secretaria Executiva: Congress Ltda., Rua Marechal Deodoro 318, Belo Horizonte, MG 30150)

XXIII Congresso Mundial de Veterinária Montreal, Canadá, 16 a 21.8.1987
(Secretaria Geral: P.O. Box 120, Succursale B, Montreal H38 3J5, Quebec, Canadá)

X Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, São Paulo, 29.8 a 4.9.1987
(Secretaria Executiva: Rua Nebraske 806, São Paulo, SP 04560; fone (011) 542-7033)

IV Congresso Internacional de Veterinária de Língua Portuguesa, V Semana de Medicina Veterinária, São Paulo, 7 a 11.9.1987

(Informações: Fac. Med. Veterinária e Zootecnia, USP, Av. Prof. Lucio Martins Rodrigues 399, Travessa 4/519, São Paulo, SP 05508; fone (011)211-3074, (011)210-2122, Ramais 464, 465, 467 e 468)

II Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Gramado, Rio Grande do Sul, 15 a 18.9.1987

(Informações: Rua Pinheiro Machado 170, Casca, RS 99260; fone (054)347-1369)

III Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Gramado, Rio Grande do Sul, 19 a 23.10.1987

(Informações: ABREVES Nacional, Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais, Cx. Postal 567, Belo Horizonte, MG 30000)

I Congresso Baiano de Medicina Veterinária, Salvador, 2 a 6.11.1987

(Informações: Dr. Filemon Paranaguá, Av. Adhemar de Barros 500, Ondina, Salvador, BA 40000)

(Information: Dr. José A. Castro, Centro de Investigaciones Toxicologicas, Zufriategui 4380, Villa Martelli, Pcia Buenos Aires, Argentina; tel. 761-0031/0531, ext. 239)

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

11. Romero C.H., Marques J.L., Rowe C.A., Flores R.M.S. & Brentano L. 1986. **Situação da doença de Aujeszky no estado de Santa Catarina em 1984.** [Situation of Aujeszky's disease in the state of Santa Catarina, Brazil, in 1984] *Pes. Agropec. Bras.* 21(12):1321-1326. Centro Nac. Pesq. Suínos e Aves, Embrapa, Cx. Postal D-3, Concórdia, SC 89700.

Continuou-se em 1984 com a vigilância sorológica para detectar a infecção pelo vírus da doença-de-Aujeszky (VDA) em plantéis de suínos no estado de Santa Catarina. Foram examinados, para presença de anticorpos neutralizantes, um total de 13.375 soros. Destes, 9.504 correspondiam a suínos de 68 a 70 plantéis de reprodutores registrados na Associação Catarinense de Criadores de Suínos (ACCS), encontrando-se 87% dos soros isentos de anticorpos neutralizantes e 13% tóxicos para as células indicadoras. De 395 soros obtidos de cinco estações de testes de reprodutores (ETRS), 85,1% eram livres de anticorpos e 14,9% tóxicos. Dos 1.666 soros pertencentes a suínos de 33 plantéis de reprodutores participando de feiras e exposições, 84,7% eram isentos de anticorpos, e 15,3%, tóxicos. De 1.769 soros que provinham de 33 granjas terminadoras, 78% não continham anticorpos, 20% foram tóxicos e 2% possuíam anticorpos neutralizantes e eram oriundos de cinco plantéis, dois destes com doença clínica. Em culturas celulares, o VDA foi isolado em cinco de doze encéfalos de suínos com suspeita de Aujeszky. Conclui-se que o VDA ainda é causa de infecção e mortalidade em alguns plantéis terminadores, ao passo que os plantéis de reprodutores do Estado e Santa Catarina encontram-se livres da infecção.

12. Almeida P.F., Oliveira, J.V. & Hayashi C.M. 1986. **Typication of rhodococcus (Corynebacterium) equi from bovine, ovine and caprine sources.** [Tipificação de *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* de origem bovina, ovina e caprina.] *Revta Microbiologia, S. Paulo*, 17(1):22-24. Centro Nac. Pesq. Caprinos, Embrapa, Cx. Postal 10, Sobral, CE 62100.

Existe considerável discrepância na literatura com relação aos principais critérios bioquímicos e de morfologia das colônias empregados para a identificação do *Rhodococcus equi*. Utilizando cepas de *R. equi* de origem bovina, ovina e caprina, concluímos que os critérios mais importantes para a identificação destas cepas foram as reações de hemólise sinérgica observadas com a toxina beta de *S. aureus* e com os organismos *L. monocytogenes*, *C. pyogenes* e *C. pseudotuberculosis*.

13. Yasuda P.H., Sulzer C.R., Giorgi W. & Soares M.E.G. 1986. **Leptospira biflexa sorotipo ranarum isolado de feto abortado de equino.** [*Leptospira biflexa* serovar ranarum isolated from aborted equine foetus.] *Revta Microbiologia, S. Paulo*, 17(1):25-27. Depto Microbiol., Inst. Ciênc. Biomédicas, USP, C.P. 4365, São Paulo, SP 01000.

É relatado o isolamento do sorotipo ranarum, pertencente ao grupo de leptospiros saprófitas, de feto abortado de equino. Provavelmente é o primeiro isolamento dessa variedade sorológica a partir de um animal de sangue quente. Aspectos taxonômicos entre leptospiros patogênicas e não patogênicas são discutidos.

14. Serafim M.B., Castro A.F.P., Colli I.A.G. & Brito J.R.F. 1986. **Detection of antitoxin against thermolabile (LT) enterotoxin of Escherichia coli in porcine sera, by immune haemolysis reactions.** [Detecção de antitoxina contra a enterotoxina termo lábil (LT) de *Escherichia coli* em soro de suínos, através de reações de imuno hemólise.] *Revta Microbiol., S. Paulo*, 17(1):31-38. Depto Microbiologia e Imunologia, Univ. Estadual Campinas, Cidade Universidade, Campinas, SP 13100.

Amostras de soros pareadas, coletadas de 69 leitões recém-nascidos, de diferentes leitegadas, foram examinadas quanto a presença de anticorpos anti-enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli*, pelos testes de imuno hemólise passiva (PIH) e imuno hemólise radial (SRIH). Quinze amostras foram negativas em ambos os testes enquanto 47 não mostraram nenhum aumento no nível de antitoxina LT. Sete amostras pareadas de soros apresentaram algum aumento no nível de anti-T. Os resultados negativos obtidos com 15 soros pareados indicam uma provável susceptibilidade dos respectivos leitões a infecções por amostras de *E. coli* LT⁺.

15. Costa E.O., Coutinho S.D., Castilho W., Teixeira C.M., Gambale W., Grandra C.R.P. & Pires M.F.C. 1986. **Etiologia bacteriana de mastite bovina no Estado de São Paulo, Brasil** [Bacterial aetiology of bovine mastitis, São Paulo State, Brazil.] *Revta Microbiol., S. Paulo*, 17(2):107-112. Depto Med. Vet. Preventiva e Saúde Animal, Fac. Med. Vet. Zootec., USP, Av. Prof. Lineu Prestes 1374/2º, São Paulo, SP 05508.

Exames microbiológicos em 2533 amostras de leite procedentes e 32 propriedades de exploração leiteira, de 18 municípios do Estado de São Paulo, Brasil, sendo 11,21% de amostras negativas ao exame microbiológico. Nas amostras positivas foram isolados: *Staphylococcus* sp. (49,23%); *Streptococcus* sp. (27,08%); *Corynebacterium* (30,67%); Enterobacteriaceae (4,26%); *Pseudomonas* sp. (1,06%) e 5,64% correspondente a várias bactérias (*Actinobacillus* sp.; *Moraxella* sp.; *Brucella* sp.; *Listeria* sp.; *Aeromonas* sp.; *Kurthia* sp.; *Alcaligenes* sp.; *Lactobacillus* sp.; *Chromobacterium* sp.; *Neisseria* sp.; *Acinetobacter* sp.; *Nocardia* sp.; *Streptomyces* sp.). Fungos filamentosos e leveduras representaram 11,68%. Predominaram os isolamentos em cultura pura, mas foram registradas culturas mistas tanto de fungos como bactérias.

16. Mores N. & Souza J.C.A. 1987. **Pleuropneumonia suína por Haemophilus pleuropneumoniae, sorotipo 5, isolado no Brasil. II. Estudo experimental de transmissibilidade.** [Swine pleuropneumonia caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*, serotype 5, isolated in Brazil. II. Experimental study of the transmissibility.] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 39(1):125-134. Centro Nac. Pesq. Suínos e Aves. Embrapa, C.P. D-3, Concórdia, SC 89700.

Para estudar a transmissibilidade do *Haemophilus pleuropneumoniae* (Hpp) três grupos de quatro suínos foram inoculados com diferentes concentrações do agente e alojados em três baias contíguas, convivendo com outros tantos não inoculados. Outro grupo de quatro animais não-inoculados permaneceu na mesma sala, à distância de 4 m dos anteriores. A

transmissibilidade do Hpp foi avaliada através de sinais clínicos, soroconversão e alterações patológicas observadas periodicamente, durante 28 dias. A totalidade dos suínos inoculados, bem como aqueles em contato direto, produziu aglutininas anti-Hpp a partir do sétimo dia pi, mas nem todos tinham lesões da doença. A severidade desta variou em função da concentração do inóculo, tanto nos animais inoculados como naqueles em contato direto. Os suínos mantidos a quatro metros dos inoculados não apresentaram soroconversão, nem lesões da doença.

DOENÇAS PARASITÁRIAS

17. Belém P.A.D., Nunes V.A., Viloria M.I.V., Pompermeyer L.G. & Vieira D. 1986. **Relato de um caso de paraceratose hereditária dos bezerros** [Lethal Trait A 46: A Case Report.] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 38(6):871-879. Depto Veterinária, Univ. Fed. Viçosa, Viçosa, MG 36570.

Descreve-se um caso de paraceratose hereditária em bezerro da raça holandesa, de um mês de idade e procedente do município de Viçosa, MG. O início dos sintomas ocorreu na segunda semana de vida, e o exame clínico revelou lesões cutâneas simétricas, não pruriginosas e seborréicas, com formação de crostas e escamas em várias partes do corpo. As biopsias de pele e do linfonodo cervical superficial indicaram, respectivamente, hiperkeratose em edema intracelular no estrato espinhoso e reação inflamatória da derme e hipoplasia linfóide, principalmente nas áreas timo-dependentes. Durante um período de observação, de 96 dias, constatou-se agravamento das lesões cutâneas, associado a frequentes episódios de pneumonia, diarreia e conjuntivite, crescimento retardado e baixo ganho em peso. A administração oral de 0,5 g de óxido de zinco por dia, durante cinco semanas, seguida de 1 g por dia, durante as semanas subseqüentes, levou ao desaparecimento total dos sintomas clínicos. A suspensão do tratamento desencadeou o recrudescimento paulatino da sintomatologia.

18. Nascimento E., Guimarães M.P., Tavares C.A.P. & Costa J.O. 1987. **Vacinação de suínos contra cisticercose.** [Vaccination of Pigs against cysticercosis.] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 39 (1) : 135-150. Int. Ciênc. Biológicas, Univ. Fed. Minas Gerais, C.P. 2486, Belo Horizonte, MG 30161.

Três grupos de suínos foram imunizados com três doses subcutâneas dos seguintes antígenos: escólex total (EST), escólex sem lípidos (ESSL) e escólex protéico (ESP) obtidos de *Cysticercus cellulosae*. A resposta imune celular avaliada pelo teste de inibição da migração de leucócitos foi positiva em todos os grupos após a segunda dose dos antígenos. Aumento acentuado do número circulante de eosinófilos foi demonstrado após a primeira dose dos antígenos em todos os animais testes em relação ao grupo controle. Os antígenos ESSL e ESP induziram a síntese de altos níveis de anticorpos circulantes detectados pela hemaglutinação indireta. A eficácia da vacinação foi avaliada através de uma infecção desafio através de uma infecção desafio de $1,0 \times 10^4$ ovos viáveis de *Taenia solium* em todos os animais. O antígeno EST induziu 33% de proteção, o ESSL, 66% e o ESP, 100%. Correlação positiva entre o teste de inibição da migração de leucócitos (MIF) positivo e proteção foi observada nos animais imunizados com o antígeno ESP.

19. Pires P.P. & Lopes C.W.G. 1985. **Espécies e Eimeria (Apicomplexa: Eimeriidae) em caprinos anglo-nubianos no Estado do Rio de Janeiro.** [Species of Eimeria (Apicomplexa: Eimeriidae) on Anglo-Nubian goats in the State of Rio de

Janeiro, Brazil.] *Arqs Univ. Fed. Rur. Rio de J.* 8(1-2):71-79. Depto Biologia Animal, Inst. Biologia, UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851.

Oocistos de *Eimeria* spp. foram obtidos de amostras de fezes de caprinos Anglo-nubianos criados nos municípios do Rio de Janeiro, de Nova Iguaçu e de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. Foram identificadas as seis espécies seguintes, com base em aspectos morfológicos e dados micrométricos dos oocistos e esporocistos: *Eimeria hirsch*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. arloingi*, *E. caprina*, *E. caprovina* e *E. christensenii*, que ocorrem em 50, 39, 35, 73, 6,91, 5,32, 3,73 e 1,97% das amostras respectivamente.

PATOLOGIA, CLÍNICA E CIRURGIA

20. Ferreira F.A., Coelho H.E. & Bastos J.E.D. 1986. **Polioencefalomalácia em bovinos no Estado de Minas Gerais.** [Polioencephalomalacia in cattle in the State of Minas Gerais, Brazil.] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 38(5):693-700. Depto Med. Animal, Univ. Fed. Uberlândia, C.P. 593, Uberlândia, MG 38400.

Descreve-se a ocorrência da polioencefalomalácia (necrose cérebro-cortical) em dois bovinos adultos de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais. Os animais mostravam-se inapetentes, com salivacão intensa, incoordenação de movimentos, paralisia, cegueira e opistótono. A morte dos animais ocorreu respectivamente com um e 49 dias após o início dos sintomas. As lesões macroscópicas, presentes no cérebro, foram semelhantes nos dois animais, apresentando o órgão consistência amolecida, circunvoluções achatadas, coloração amarelo-acinzentada, vasos meníngeos túrgidos e hemorragias subpiais. Essas lesões correspondiam, microscopicamente, a áreas de necrose neuronal e triglólise disseminada, edema peri-neuronal, gliose e hemorragia.

21. Sousa J.C., Gonçalves E.M., Viana J.A.C. & Darsie G. 1987. **Deficiências minerais em bovinos de Roraima, Brasil. IV. Magnésio, sódio e potássio.** [Mineral deficiency in cattle of Roraima, Brazil. IV. Magnesium, sodium and potassium.] *Pesq. Agropec. Bras.* 22(1):89-98. Centro nac. Pesq. Gado e Corte, Embrapa, C.P. 154 Campo Grande, MS 79100.

Foi realizado um estudo das deficiências minerais de bovinos em seis regiões localizadas ao nordeste do Território Federal de Roraima, onde foram amostrados solo, forrageiras e tecido animal (sangue e osso) durante as épocas seca e chuvosa. Teor médio de Mg no solo foi encontrado apenas na região do Surrão (0,500 meq/100 g). Todas as outras regiões apresentaram níveis baixos. Nível médio de K também foi observado em apenas uma região, a de Caumé, com 65 ppm. Nas demais regiões os níveis de K no solo foram baixos. Os níveis de Na no solo variaram de 47 ppm a 102 ppm entre regiões. As forrageiras apresentaram teores de Mg adequados para bovinos de corte em crescimento e terminação, porém aparentemente inadequados para vacas em lactação, em cinco das seis regiões estudadas. Os níveis de Na e K nas forrageiras foram deficientes em todas as regiões. Os níveis de Mg, Na e K nas forrageiras foram significativamente menores ($P < 0,05$) na época seca. As gramíneas melhoradas apresentaram teores de Mg adequados a todas as categorias de bovinos de corte e as espécies nativas mostraram níveis adequados deste elemento apenas para bovinos de corte em crescimento e terminação. Os níveis de Mg plasmáticos dos bovinos foram normais nas duas épocas do ano. Nas cinzas dos ossos das costelas os teores de Mg foram baixos, variando de 0,32% a 0,44% nas vacas em lactação e de 0,28% a 0,47% nos bovinos jovens.

DIAGNÓSTICO ALÉRGICO DA TUBERCULOSE BOVINA

A tuberculinização intradérmica tornou-se o método de diagnóstico da tuberculose bovina reconhecido e usado em todo o mundo por sua alta sensibilidade e especificidade. No entanto, para que sua eficácia alcance índices médios entre 95 a 98%, é necessário obedecer a um conjunto de requisitos que envolvem a qualidade da tuberculina, a precisão do equipamento, o local da tuberculinização, a técnica de tuberculinizar, a interpretação da reação, a rotina de trabalho na fazenda e aspectos de saúde pública a serem observados.

1. A escolha da tuberculina

As pesquisas demonstraram que o melhor alérgeno atualmente disponível é a tuberculina bovina PPD (derivado de proteína purificada) elaborada com cultura de *Mycobacterium bovis* AN₅, contendo 0,1 mg/ml ou 5.000 UI por dose. Para o diagnóstico diferencial recomenda-se a tuberculina aviária PPD que a EM-BRAPA elabora com as culturas de *M. avium* D₄ e 20.485, contendo 0,05 mg/ml ou 2.500 UI por dose. A dose de tuberculina a ser aplicada em cada animal é de 0,1 ml, tanto para a tuberculina bovina quanto para a aviária, independente da idade ou tamanho do animal. É importante que cada país adote um único tipo de tuberculina, controlado oficialmente partida por partida.

2. Equipamento adequado

Na tuberculinização é importante que o alérgeno seja inoculado intradermicamente, na dose exata de 0,1 ml. Isto é facilitado com seringas especiais para a tuberculinização como por exemplo a Syntema da Hauptner* para carpules ou a seringa da McLintock** com cilindro e êmbolo de aço inoxidável, ambas munidas com um sistema de alavanca que fornece o volume de 0,1 ml por dose.

A intensidade da reação alérgica é avaliada no local da inoculação da tuberculina pela mensuração da dobra da pele antes da tuberculinização e comparada com a feita entre 72 a 96 horas depois, por meio de um cutímetro. Muito adequado e preciso é o cutímetro de rola da Hauptner* que, munido por um sistema de relógio, permite a leitura direta em frações de milímetro. Outra vantagem do cutímetro são as pinças alargadas com uma superfície de 4 cm², o que assegura alta fidelidade à mensuração.

3. Local da tuberculinização

A pele do bovino apresenta maior sensibilidade à reação alérgica da tuberculinização na região cervical, seguida da omoplata e em menor escala no períneo. Apesar disso, a pele da prega ano-caudal é suficientemente sensível para o teste de rotina usado na vigilância sanitária de rebanhos. A escolha de local mais sensível para a inoculação da tuberculina é recomendada para o diagnóstico individual da tuberculose em animais de rebanhos suspeitos ou tuberculosos. O objetivo principal desta escolha é detectar bovinos portadores de lesões já muito evoluídas e que, conseqüentemente, já estejam na fase pré-anérgica. Nesta circunstância a rea-

ção alérgica ainda pode ser positiva na região do pescoço e paleta, mas negativa na pele da prega ano-caudal. Como a pele do períneo é séptica, há maior probabilidade de aninharem-se infecções no ponto da inoculação da tuberculina e resultar numa falsa reação positiva. Estes inconvenientes não ocorrem na pele do pescoço ou da omoplata.

Em nosso meio, recomenda-se fazer a tuberculinização na pele da omoplata por razões práticas, pois a grande maioria dos criadores de gado de leite prendem seus animais por meio do sistema de canzil, que dificulta a aproximação do operador junto ao pescoço do animal. Por outro lado, as vacas mestiças zebuínas atingem com certa facilidade o instrumental ou a mão do operador com o chifre por meio de movimentos rápidos em atitude de defesa.

Em rebanhos "problemas" realiza-se sempre a tuberculinização comparativa em que, rotineiramente, a tuberculina aviária é inoculada na frente da espinha acromiana da omoplata e a tuberculina bovina atrás, a cerca de 15 cm uma da outra. Preconiza-se também realizar na paleta a tuberculinização simples com tuberculina bovina, como rotina na vigilância sanitária de rebanhos negativos.

4. Técnica de tuberculinizar

Inicia-se com a inspeção e palpação da pele no ponto em que se pretende fazer a inoculação, na qual não deve haver nódulos ou lesões da pele, bem como áreas de endurecimento por fibroses cicatriciais de lesões anteriores. Marca-se o local, depilando-o numa área do tamanho de uma caixa de fósforo e, em seguida, mede-se a espessura da dobra da pele, elevando-a até emparelhar com beigos do cutímetro. Após ligeira acomodação do cutímetro sobre a dobra da pele, o ponteiro pára, e indica a espessura em milímetro e frações, o que deve ser registrado em protocolo próprio. Antes de ser iniciada a primeira inoculação com a seringa recém-carregada, deve-se desprezar a primeira dose, mantendo a agulha para cima, para expulsar possível presença de ar no cilindro (ou carpule).

A inoculação deve ser feita no centro da área depilada, sem prévia desinfecção da pele, com lenta introdução da agulha, para o animal não se assustar o que dificulta a correta aplicação. A agulha deve penetrar na pele obliquamente e tanto mais tangencialmente quanto mais fina for a espessura desta. A pele pode ser fixada entre os dedos da mão oposta do operador. É importante que a tuberculina seja inoculada intradermicamente o que se pode comprovar pela resistência que o operador sente ao acionar a alavanca da seringa e pelo abaulamento da pele ao redor da agulha. A agulha não deve ser retirada imediatamente após a injeção para que, dentro de 1 a 2 segundos, a tuberculina possa difundir-se entre o tecido vizinho e assim evitar algum refluxo. Esta infiltração local deve persistir e, rotineiramente, o operador deve palpá-la com a ponta do dedo, assegurando assim a correta tuberculinização. Após 72-96 horas faz-se a leitura através de nova mensuração da pele e análise das alterações locais.

5. Interpretação da tuberculinização

A interpretação do diagnóstico alérgico da tuberculose requer uma análise, considerando o histórico e aspectos clínicos do animal e/ou rebanho, o aumento da espessura da dobra da pele (AEDP) e características da reação alérgica.

O histórico e dados clínicos reforçam ou excluem dúvidas sobre casos de anergia, interferência de estresse, reações inespecíficas e fase de incubação alérgica. A leitura do AEDP e os aspectos da reação alérgica a serem observados rotineiramente na tuberculinização simples com a respectiva interpretação estão sintetizados no Quadro 1.

Quadro 1. Chave de interpretação da reação alérgica simples

Reação	AEDP (mm)	Reação dolorosa	Consistência	Outras alterações
Negativa	0.0-1.9	Sem dor	Normal	Ausentes
Suspeita	2.0-4.0	Pouca dor	Endurecida	Ausentes
Positiva	3.0 ou >	Muita dor	Edematoso	Exudato, necrose, enfartamento de vasos e gânglios linfáticos

Na tuberculinização comparativa (simultânea) com as tuberculas bovina e aviária, faz-se leitura obedecendo os dados do Quadro 1 para ambos os alérgenos, seguindo depois os critérios de interpretação do Quadro 2.

Quadro 2. Chave de interpretação da tuberculinização comparativa (simultânea)

Testes comparativos	Diferenças (mm)	Resultado da tuberculinização
TB menor que TA ^a	--	Negativo
TB maior que TA	0.0 - 1.9	Negativo
TB maior que TA	2.0 - 2.9	Suspeito
TB maior que TA	3.0 ou >	Positivo

^a TB = Tuberculina Bovina, TA = Tuberculina Aviária.

Se a tuberculinização for realizada na prega ano-caudal, a leitura da reação é interpretada como:

a) Negativa, quando não há alteração evidente no local da inoculação da tuberculina;

b) Suspeita, quando há tumefação local discreta, difusa ou sob forma de nódulo até o tamanho de uma azeitona pequena;

c) Positiva, quando há reação local igual ou maior do que uma azeitona, ou quando houver tumefação difusa da prega inoculada cuja espessura seja o dobro da prega oposta.

6. Rotina de trabalho na fazenda

O diagnóstico alérgico da tuberculose requer alguns cuidados especiais para que o resultado da tuberculinização de um rebanho seja bem aproveitado. Recomenda-se, como rotina, que:

a) A tuberculinização seja feita sempre em todos os bovinos, mormente em se tratando de rebanho suspeito ou tuberculoso, desde os bezerros recém-nascidos até os bois de carro;

b) Nos rebanhos infectados ou suspeitos, a tuberculinização deve ser repetida nos animais não reagentes, de 8 em 8 semanas, até que dois testes sucessivos apresentem resultados negativos. Num rebanho tuberculoso deve haver animais já infectados, mas que ainda não estão reagindo (fase pré-alérgica de 21 a 42 dias), necessitando-se o reteste;

c) Num rebanho com grande número de bovinos reagentes, seja necropsiado um ou mais animais, dentre os clinicamente doentes para confirmar o diagnóstico da tuberculose por exames anátomo-histopatológicos e/ou bacteriológico;

d) Na anamnese de um rebanho tuberculoso deve ser lembrada a hipótese de que possa haver portadores de tuberculose entre os tratadores, gatos e cães da fazenda;

e) Sendo em geral, a intensidade da reação alérgica inversamente proporcional à evolução da tuberculose, ou seja, lesão pequena/reação grande e vice-versa, animais com tuberculose muito evoluída podem encontrar-se na fase hipotalérgica ou na anérgica, situação em que é decisivo o exame clínico para firmar o diagnóstico;

f) O fazendeiro seja estimulado a observar o comportamento dos animais, apontando os que têm tosse seca crônica, dificuldade respiratória durante a movimentação ou em dias muito quentes, problemas digestivos como timpanismo, o que facilita o diagnóstico clínico e evita a permanência no rebanho de um animal anérgico, mas eliminador de *Mycobacterium bovis* e que venha reinfectar o rebanho;

g) Se houver a separação de bovinos infectados para tratamento ou outra razão, analisar o manejo do rebanho para evitar contacto dos animais doentes com os sadios através de cercas ou em cochos e bebedouros coletivos;

h) Havendo a ocorrência de número relativamente grande de reações alérgicas pouco sensíveis (pouca dor) e pouco intensas (no limiar da positividade) em rebanhos que anteriormente eram indenes de tuberculose, estas podem ser reações inespecíficas. Neste caso, o reteste do rebanho deve ser feito com tuberculinização comparativa (simultânea).

7. Aspectos de Saúde Pública

Ao ser firmado o diagnóstico da tuberculose de um rebanho, deve ser recomendado o exame de tuberculose dos tratadores e demais empregados que tenham tido contato direto com os animais, pelas seguintes razões:

a) As pessoas podem ter contraído a tuberculose infectando-se com *M. bovis* eliminado pela tosse ou pelo leite dos bovinos. São particularmente sensíveis à infecção as crianças e os adolescentes que, no meio rural, nem sempre são imunizados;

b) O tratador que adquiriu a infecção por *M. bovis* quando jovem pode tornar-se um portador e eliminador quando adulto diante de condições estressantes e assim ter sido ele a fonte de contágio do rebanho;

c) O tratador pode ainda ser portador de uma tuberculose pulmonar aberta, humana, causada por *M. tuberculosis* e ao tossir ou escarrar no cocho, expor os bovinos a uma infecção transitória. Essa infecção, no entanto, causa uma sensibilização alérgica idêntica a da infecção por *M. bovis*, pois estes dois agentes são antigenicamente quase iguais, mascarando o diagnóstico;

d) Os gatos e cães mantidos no estábulo, principalmente quando alimentados com leite cru também devem ser examinados porque estes se infectam com *M. bovis*. Nos gatos a tuberculose pode evoluir para a forma pulmonar aberta e, assim, além de constituir-se fonte de contágio para crianças e adolescentes, ele pode ser a causa de reinfecção do rebanho. Os cães, embora mais raramente podem ser fonte de contágio para o homem.

JEROME LANGENEGGER

EMBRAPA-UAPNPSA, Km 47
23851 Seropédica, Rio de Janeiro

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, começando de *a* em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço de 12 batidas, à esquerda.

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

ALÉRGENO PARA O DIAGNÓSTICO DA LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS¹

CHARLOTTE HUBINGER LANGENEGGER², JEROME LANGENEGGER² e SERGIO GUEDES COSTA²

ABSTRACT.- Langenegger C.H., Langenegger J. & Costa S.G. 1986. [An allergen for the diagnosis of caseous lymphadenitis in goats.] Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(2):27-32. Embrapa-UAPNPSA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851, Brazil.

An allergen, designated "lymphadenin" consisting of water-soluble protein, was obtained from washed *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*ovis*) after cultivation of the bacteria for 5 days at 37°C in trypticase soy broth. The protein was precipitated by 4% trichloroacetic acid, after washing by 0,022 M KH_2PO_4 redissolved in 0,066 M Na_2HPO_4 pH 9.0 and preserved by addition of glycerin and phenol at a final concentration of 10.0 and 0.5% respectively, and pH 7.0. For use the "lymphadenin" had been standardized to contain 0.25 mg protein/ml. The effectiveness of "lymphadenin" was first tested in previously sensitized guinea pigs, injecting intradermally 0.1 ml of 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16 dilutions of the allergen into each animal. After 24 hours, local allergic reactions appeared as circular erythematous areas with average diameters of 15.7, 13.1, 9.9 and 7.9 mm respectively. Nonsensitized guinea pigs, used as controls, did not develop any reactions. Intradermal injection of 0.1 ml undiluted standardized "lymphadenin" into the shoulder region of each of 40 goats, clinically affected with Lymphadenitis, gave rise to allergic reactions which reached their maxima 48 hours after application. The increase in the thickness of skin-folds (ITSF) at the side of injection varied from 1.6 to 12.2 mm with a mean of 6.04 ± 2.87 mm. In 40 healthy goats from a herd free of Lymphadenitis the ITSF ranged between 0.0 and 1.5 mm with a mean of 0.57 ± 0.4 mm.

INDEX TERMS: Pseudotuberculosis, Caseous Lymphadenitis, goat, allergen, diagnosis.

SINOPSE.- Foi desenvolvida uma sensitina, designada por "linfadenina" constituída por proteína hidrossolúvel extraída de massa bacteriana lavada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*ovis*), obtida por cultura em caldo de soja triptica, incubada a 37°C, durante 5 dias. A proteína foi precipitada em solução a 4% de ácido tricloro-acético e, após lavagens em solução 0,022 M de KH_2PO_4 , foi redissolvida em solução 0,066 M de Na_2HPO_4 com pH 9,0 e diluída e preservada em tampão glicero-fenica a 10,0 e 0,5% respectivamente e pH 7,0. A "linfadenina" pronta para uso, foi padronizada para a concentração final de 0,25 mg/ml de proteína. A avaliação da eficácia da "linfadenina" foi feita inicialmente em cobaios, previamente sensibilizados, pela inoculação das diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 do alérgeno por via i.d., em doses de 0,1 ml, e que revelaram, após 24 horas, reações alérgicas locais sob forma de halos eritematosos com diâmetros médios de 15,7, 13,1, 9,9 e 7,9 mm, respectivamente. Nos cobaios normais não houve reações dignas de nota. A inoculação i.d. de 0,1 ml da "linfadenina" padronizada, na região da omoplata, em 40 caprinos portadores de lesões de linfadenite caseosa, revelou reações alérgicas locais, com maior intensidade após 48 horas e com aumentos da espessura da dobra da pele (AEDP), variando entre 1,6 a 12,2 mm, com média de $6,04 \pm 2,87$ mm. Em 40 caprinos de

rebanho livre de linfadenite, o AEDP variou de 0 a 1,5 mm, com média de $0,57 \pm 0,40$ mm.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Pseudotuberculose, linfadenite caseosa, caprino, diagnóstico alérgico, sensitina.

INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*ovis*) ocorre em ovinos e caprinos em várias partes do mundo. No Brasil, a doença é particularmente freqüente em caprinos da região nordeste. Estima-se que a maioria dos rebanhos estão infectados e que a prevalência clínica atinge até 30% dos animais (Silva 1972, Costa et al 1973). À medida que se melhora a assistência zootécnica e sanitária aos rebanhos de caprinos, tanto na região nordeste como nas demais, torna-se necessário contar com meios de diagnóstico da infecção, já em sua fase pré-clínica e que sejam de fácil aplicação. Vários testes sorológicos e alérgicos foram e outros ainda estão sendo ensaiados, faltando, contudo, concluir a necessária avaliação crítica e/ou determinar a viabilidade do uso prático, a campo, em nossas condições.

Testes alérgicos foram ensaiados por vários pesquisadores. Cesari (1930), na França, observou que a inoculação de 0,2 ml do filtrado de culturas velhas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (bacilo de Preisz-Nocard) no coxim plantar de cobaios anteriormente infectados com o mesmo germe vivo, provocou uma

¹ Aceito para publicação em 10 de dezembro de 1986.

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

reação de hipersensibilidade local semelhante à reação alérgica da tuberculina em cobaios com tuberculose. O autor designou o alérgeno por Preisznocardina e sugeriu que o teste alérgico poderia ser usado para o diagnóstico da linfadenite caseosa do ovinho.

No ano seguinte, Cassamagnaghi (1931), no Uruguai, baseando-se na observação de Cesari (1930), elaborou a Preisznocardina, cultivando o *C. pseudotuberculosis* em caldo de Martin, durante 2 a 3 semanas a 37°C e depois filtrou a cultura em Vela de Chamberland L3. A eficácia do alérgeno foi testada em 14 ovinos infectados experimentalmente, nos quais, após 3 semanas, foi aplicado o alérgeno em doses de 0,1 ml, intradermicamente, na prega ano-caudal. A leitura do teste, feita após 48 e 72 horas, revelou reações locais do tamanho de ovo de pombo em todos os animais, enquanto que 11 ovinos não infectados, não apresentavam reação alérgica. Em outro experimento, utilizando 80 ovinos de abate oriundos de rebanho infectado, 18 animais apresentaram reação alérgica no ponto de inoculação e no exame pós-morte foram encontradas lesões da linfadenite caseosa em cada animal. O autor não faz referência sobre os achados dos ovinos não reagentes.

Na Austrália, Carne (1932) procurou avaliar a sensibilidade e a especificidade do teste alérgico para o diagnóstico da linfadenite caseosa em ovinos. Para tanto, preocupou-se, inicialmente, em obter um alérgeno (pseudotuberculina) seguindo a técnica de elaboração da tuberculina de Koch. Cultivou *C. pseudotuberculosis* em caldo, durante várias semanas e depois esterilizou a cultura em vapor fluente, removendo as bactérias por filtração em papel xarope.

Testou a eficácia do alérgeno em 2 ovinos experimentalmente infectados há 30 dias e em ovinos jovens indenes, aplicando-o, intradermicamente, na prega ano-caudal, em dose de 0,2 ml. O autor testou depois o mesmo alérgeno em 50 ovelhas adultas procedentes de rebanho altamente acometido pela linfadenite caseosa. A leitura feita 48 e 72 horas após inoculação revelou o resultado resumido no Quadro 1.

Neste resultado chamou atenção que nos 25 ovinos não reagentes foram encontradas lesões da linfadenite caseosa em 13 (52%), revelando pouca especificidade do alérgeno, o que motivou o autor a utilizar a filtração da cultura em velas de Chamberland L3, como realizada por Cassamagnaghi (1931). Com a sensítina assim obtida fez novo teste em mais 50 ovelhas obtendo o resultado demonstrado no Quadro 2.

Neste resultado, dos 19 animais reagentes 5 (26,3%) apresentaram lesões da linfadenite caseosa. Diante destes resultados o autor concluiu que o teste alérgico não havia a necessária eficiência.

Quadro 1. Resultado do teste alérgico

Intensidade da reação ^(a)	Nº de reagentes	Exame pós-morte	
		Com lesões	Sem lesões
+++	3	2	1
++	5	5	—
+	5	4	1
S	12	5	7
—	25	13	12

(a) +++ = reação local maior do que 3 cm de Ø;

++ = entre 1 a 3 cm;

+ = entre 0,5 e 1 cm;

— = negativo.

Quadro 2. Resultado do teste com alérgeno filtrado em velas Chamberland L3

Intensidade da reação ^(a)	Nº de reagentes	Exame pós-morte	
		Com lesões	Sem lesões
+++	1	—	1
++	13	7	6
+	15	7	8
S	2	1	1
(—)	19	5	14

cia. A elaboração de alérgeno com grande número de amostras de *C. pseudotuberculosis* e o aumento da concentração não melhoraram os resultados, levando o autor a concluir que a resposta imunitária do animal era deficiente e que o teste alérgico para o diagnóstico da linfadenite caseosa, não era adequado.

Nos Estados Unidos, Cameron & McOmie (1940), tentando correlacionar os resultados dos testes da soro-aglutinação e o da reação alérgica no diagnóstico da linfadenite caseosa em ovinos, elaboraram o alérgeno utilizado por Train (1934) no diagnóstico da linfangite ulcerosa do equino, também denominado Preisznocardina, que consistia no cultivo de *C. pseudotuberculosis* em caldo de coração de bovino, durante 34 dias, a 37°C. O sobrenadante da cultura foi reduzido a 1/3 do volume original por evaporação e depois filtrado em Seitz E. K. A sensitina, assim preparada, foi aplicada em dose de 0,2 ml, intradermicamente, no espaço axilar e a leitura feita 72 horas após. Foram utilizadas 45 ovelhas adultas das quais 8 reagiram positivamente e 2 suspeitas porém apenas 4 tinham lesões nos linfonodos externos. Em duas ovelhas portadoras de lesões, o teste alérgico foi negativo. Como os animais não puderam ser sacrificados após o teste, não foi possível avaliar melhor o desempenho da prova alérgica.

No Egito, Farid & Mahmoud (1960/61) utilizaram como sensitina o filtrado esteril de cultura de *C. pseudotuberculosis* em caldo simples com pH 7,4, incubada durante 2 meses e depois morta por autoclavagem a 120°C por 20 minutos. O filtrado foi concentrado à metade do volume por evaporação em banho-maria a 50°C. A sensitina assim obtida foi aplicada intradermicamente em ovinos na região do espaço axilar após depilação e medida a espessura da dobra da pele do local. A leitura, feita a cada 12 horas medindo a espessura da dobra da pele com paquímetro, revelou que às 48 horas a reação alcançou o seu valor máximo, na maioria dos casos. A eficiência da sensitina foi avaliada: a) em 20 ovinos portadores de lesões clínicas de linfadenite caseosa dos quais apenas 1 (5%) não reagiu, 3 (15%) apresentaram diferenças entre 1 e 2 mm, 7 (35%) tiveram reações com 3 mm de diferença e os demais 9 animais revelaram reações superiores com diferenças até 8 mm; b) os animais procedentes de rebanhos negativos não registraram reações, no entanto, os 10 ovinos oriundos de rebanho infectado reagiram em sua totalidade, sendo que 2 (20%) com aumentos da espessura da dobra da pele de 1 e 2 mm, 2 com 3 mm, tendo os demais, reações superiores atingindo mesmo 16 mm de diferença.

Em Pernambuco, Brasil, Costa Filho (1978), pretendendo obter um método de diagnóstico precoce da linfadenite caseosa dos caprinos, através da prova alérgica, elaborou uma sensitina a partir da suspensão bacteriana de *C. pseudotuberculosis* e de *C. pyogenes*, fenolizada a 0,5%, contendo 1,2 bilhões de germes por ml. A eficiência do alérgeno foi testada em 5 caprinos portadores da linfadenite caseosa e em 10 animais indenes, através da inoculação da sensitina, por via intradérmica, na dose de 0,1 ml, na

prega ano-caudal e em alguns casos também na pele do abdômen. Em 5 dos 10 caprinos indenes foi aplicada apenas a mesma dose de solução salina fenicada a 0,5%. A leitura da reação, feita às 24, 48 e 72 horas, por meio de paquímetro para avaliar o aumento da espessura da dobra da pele, revelou progressivo crescimento da reação alérgica nos 5 caprinos infectados, com aumento da espessura da dobra da pele entre 6,0 a 9,3 mm. Nos 10 testemunhos não houve reação perceptível. Não foram examinados rebanhos infectados.

Renshaw et al. (1979) ensaiaram um alérgeno obtido por sonificação de bactérias lavadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A massa bacteriana sonificada foi diluída com salina até a densidade ótica correspondente ao tubo nº 5 do nefelômetro de McFarland. Foi acrescido 0,5 g/l de azida sódica e incubada a 37°C durante 12 horas para assegurar a esterilidade.

O alérgeno foi testado em 26 ovinos portadores do síndrome da ovelha magra nos quais foram encontrados alta incidência de abscessos internos causados por *C. pseudotuberculosis*. O resultado revelou reações alérgicas em 67,8% destes animais, mas apenas 10/18 (55,5%) dentre os que tiveram abscessos internos e dos quais foi isolado o agente da linfadenite caseosa.

No Rio de Janeiro, Langenegger & Langenegger (1984) tentaram obter um alérgeno a partir de massa bacteriana de *C. pseudotuberculosis* desintegrada por hidrólise com ácido sulfúrico e a(s) proteína(s) por precipitação com ácido tricloroacético, mas os resultados não foram animadores.

No presente trabalho descreve-se a obtenção de uma sensítina a base de proteína hidrossolúvel, designada por "linfadenina" cuja eficácia foi avaliada em cobaios sensibilizados e caprinos portadores de lesões de linfadenite caseosa, em experimentos pilotos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Técnica de elaboração da "linfadenina"

a) *Cultura estoque*. Foi utilizada a amostra nº 303 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolada de caprino e procedente do Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos (CNPC), em Sobral, CE.

b) *Produção de massa bacteriana*. A semente foi preparada por repique da cultura estoque em tubos de caldo de soja tríplica da Difco e após 24 horas de crescimento, alíquotas de 10 ml da cultura semente eram inoculadas em 400 ml do mesmo meio contido em garrafas de Roux com capacidade de 2 litros. Após incubação por 5 dias a 37°C, a massa bacteriana foi separada do meio por centrifugação a 3.00 rpm e lavada duas vezes com salina.

c) *Extração da proteína solúvel*. A massa bacteriana foi suspensa em água destilada na proporção de 1:5 e mantida sob agitação durante 2 horas para então ser autoclavada a 121°C durante 20 minutos. Em seguida, as bactérias foram separadas por centrifugação da solução contendo a proteína.

d) *Concentração da proteína solúvel*. A proteína contida no sobrenadante foi precipitada pelo ácido tricloroacético. A cada 900 ml da solução colocada em proveta graduada de 1 litro, adicionou-se 100 ml de solução a 40% de ácido tricloroacético, dando a concentração final de 4%. O precipitado foi concentrado por sifonagem após decantação por uma hora e, logo em seguida, por centrifugação, desprezando-se o sobrenadante. Seguiram-se duas lavagens com solução a 1% de ácido tricloroacético e finalmente duas lavagens com solução 0,022 M de KH_2PO_4 por centrifugação.

e) *Determinação da concentração de proteína da "linfadenina"*. A massa de proteína foi dissolvida com solução 0,066 M de Na_2HPO_4 com pH 9,0 na proporção aproximada de 1 g para 10 ml do dissolvente. A este "concentrado de proteína" adicionou-se a solução preservativa na proporção de 1 parte desta para

Quadro 3. Resultado do teste alérgico com linfadenina com 0,25 mg/ml de proteína em caprinos clinicamente afetados com a linfadenite caseosa

Nº do caprino	Linfonodo com lesão(a)	AEDP(b) (mm)
58	1 E	9,1
1032	4 D	5,6
1048	1 E	7,7
1104	1 E	12,0
1118	1 D	10,0
1118(c)	1 D	1,6
1206	3 D	9,0
1206(c)	3 D	2,1
1223	1 D	12,0
1250	2 E	4,0
1226	1 D	4,6
1244	1 D	5,5
1256	2 D	8,0
1256(c)	2 D	7,0
1288	1 E	6,5
1289	3 E	4,2
1292	2 E	12,2
1292(c)	2 E	3,0
1296	3 E	6,8
1296(c)	3 E	2,3
1400	2 D	2,5
1414	2 D	4,8
1424	1 D	10,5
1424(c)	1 D	2,5
1497	3 E	5,0
1125	4 E	4,5
1125(c)	4 E	8,3
1129	2 D	6,3
1129(c)	2 D	4,5
732	2 E	3,0
733	3 D	7,2
735	3 D	7,1
736	1 E	4,7
737	3 D	6,8
739	3 D	5,6
741	4 D	7,0
742	1 D	1,7
744	3 D	3,1
745	1 D	5,0
748	3 D	4,9
Total 40	Média 6,04 ± 2,87 mm	

(a) 1 = Linfonodo preparotidiano (D = direito, E = Esquerdo),
2 = Linfonodo submaxilar D e E,
3 = Linfonodo preapular D e E,
4 = Linfonodo precarural D e E.

(b) AEDP = aumento da espessura da dobra da pele.

(c) Teste repetido cerca de seis semanas depois.

Quadro 4. Resultado do teste alérgico com linfadenina diluída (0,12 mg/ml de proteína) em caprinos portadores de lesões da linfadenite caseosa

Nº do caprino	Linfonodo com lesão ^(a)	AEDP ^(b)
1034	1 D	5,2
1105	3 D	3,7
750	1 E	2,5
753	1 D	1,2
753 ^(c)	1 D	1,4
756	1 D	6,8
760	1 E	2,7
1119	1 E	5,1
1126	1 D	6,9
1209	2 D	4,8
1238	3 D	7,0
1254	3 D	6,3
1339	1 D	4,0
80	3 D	9,0
80 ^(c)	3 D	4,3
1114	3 D	6,1
1255	1 D	7,2
1227	2 D	3,7
1248	4 E	3,9
1282	3 E	7,5
1297	3 E	2,4
1327	3 E	2,7
Total 22	Média 4,74 ± 2,14	

(a) 1 = Linfonodo prepatotidiano (D = direito, E = Esquerdo),

2 = Linfonodo submaxilar D e E,

3 = Linfonodo precapular D e E,

4 = Linfonodo precural D e E.

(b) AEDP = aumento da espessura da dobra da pele.

(c) Teste repetido cerca de seis semanas depois.

5 do concentrado protéico. A solução preservadora compõe-se de 300 ml de glicerina, 15 g de NaCl, 15 g de fenol e 300 ml de tampão fosfatado 0,066 M pH 7,0.

Partindo de uma alíquota deste concentrado protéico preservado, determinou-se a concentração de proteína por ml, com o sistema micro-Kjeldahl. Conhecido o teor de proteína, preparou-se diluições desta para 0,25 mg/ml e 0,12 mg/ml de proteína com o seguinte diluente: 500 ml de tampão fosfatado 0,066 M pH 7,0, 50 ml de glicerina neutra, 2,5 g de NaCl e 2,5 g de fenol. A esterilidade de cada diluição foi assegurada com a filtração em milipore com poros de 0,22 µm. A "linfadenina" assim elaborada manteve-se estável por um ano, mantida refrigerada à temperatura entre 4 e 8°C.

2. Avaliação da eficiência da "linfadenina" em cabaios

a) *Sensibilização de cabaios*. Foram infectados grupos de 10 animais adultos, albinos, por via s.c., com a cultura nº 303, de *C. pseudotuberculosis*, isoladas de caprinos e mantidas em meio de Loeffler. Cada cultura era semeada em caldo de soja triptica e, após 24 horas de crescimento, inoculada por via s.c., em doses de 0,1 ml diluição 10⁻⁶ que continham entre 1 a 5 bactérias. Desta forma desenvolviam-se inicialmente, abscessos no local da inoculação e posteriormente também lesões internas com sobrevida dos cabaios entre 2 e 4 meses. Os animais estavam bem sensibilizados após a 4ª semana da infecção.

b) *Execução do teste alérgico em cabaios*. Tanto os 10 cabaios sensibilizados quanto um número igual de testemunhos indenes, foram depilados em ambos os lados do tórax e do abdômen com auxílio de tesoura elétrica e depilador químico. A "linfadenina" com 0,25 mg/ml de proteína foi inoculada, por via i.d., em dose de 0,1 ml das diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16, simultaneamente, com a seringa "Syntena" da Hauptner³ de tuberculinização.

Quadro 5. Resultado da linfadenização de caprinos de rebanho indene. Comparação entre as linfadeninas com concentração de 0,25 a 0,12 mg/de proteína

Nº do caprino	AEDP ^(a) (mm)	AEDP ^(b) (mm)
703	0,2	0,5
707	0,4	0,4
708	0,1	0,5
711	0,6	0,6
712	0,9	1,0
713	0,5	0,6
731	0,2	0,7
1257	1,3	0,2
1261	0,6	0,8
1263	0,3	0,1
1272	0,2	0,5
1274	0,4	0,2
1280	0,9	0,8
1271	1,4	0,6
1266	0,6	0,2
764	0,5	0,2
701	0,7	0,3
704	0,4	0,5
729	1,0	0,3
730	1,0	0,4
705	0,4	0,4
706	0,3	0,2
710	1,5	1,0
717	0,1	0,2
718	0,1	0,4
719	0,1	0,5
720	0,5	0,1
721	0,4	0,2
722	0,2	0,6
723	0,1	0,1
724	1,5	1,2
725	0,8	0,5
726	1,2	0,6
727	0,3	0,1
728	0,6	1,3
1204	0,9	0,3
1260	0,2	1,0
1273	0,6	0,5
1277	0,3	0,2
1359	0,7	0,5

(a) Linfadenina com 0,25 mg/ de proteína.

(b) Linfadenina com 0,12 mg/ de proteína.

³ H. Hauptner, Kuller Strasse 38-44, Solingen, Alemanha Ocidental.

Quadro 6. Teste de eficiência da linfadenina (0,25 mg/proteína/ml)

Nºcobaio sensibilizados	Dose (ml)	Diluições				Nºcobaio normais	Dose (ml)	Diluições			
		1:2	1:4	1:8	1:16			1:2	1:4	1:8	1:16
1	0,1	15(a)	13	10	7	1	0,1	0,2	0,2	0,0	0,0
2	0,1	15	13	10	8	2		0,3	0,1	0,1	0,0
3	0,1	15	12	9	6	3		0,4	0,4	0,1	0,1
4	0,1	15	12	9	8	4		0,0	0,0	0,0	0,0
5	0,1	18	15	10	8	5		0,5	0,3	0,2	0,1
6	0,1	15	12	10	9	6		0,2	0,1	0,0	0,0
7	0,1	16	14	10	8	7		0,3	0,1	0,0	0,0
8	0,1	16	14	10	8	8		0,4	0,2	0,2	0,0
9	0,1	14	12	10	8	9		0,1	0,0	0,1	0,0
10	0,1	18	14	11	9	10		0,3	0,2	0,0	0,0
Médias		15,7	13,1	9,9	7,9	Médias		0,27	0,26	0,07	0,2

(a) Halo de eritema em mm.

3. Avaliação da eficácia da "linfadenina" em caprinos.

Execução do teste alérgico em caprinos. A "linfadenização" em caprinos foi realizada, por via i.d., na região da omoplata, em áreas previamente depiladas de 4 x 4 cm de lado com o auxílio de tesoura elétrica ou manual. Após a mensuração da espessura da dobra da pele com o auxílio do cutímetro da Hauptner, o alérgeno foi inoculado no centro da área demarcada, em dose de 0,1 ml, com o auxílio da seringa "Syntena" da Hauptner. A leitura e a interpretação da reação alérgica foram realizadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação, com o auxílio de novas medições da espessura da dobra da pele.

RESULTADOS

A sensitina, designada por "linfadenina" foi obtida por extração de uma proteína hidrossolúvel da massa bacteriana de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*ovis*), concentrada pela precipitação com ácido tricloroacético, preservada em tampão glicero-fenica e padronizada para o uso com uma quantidade de 0,25mg/ml de proteína.

O resultado do teste alérgico em cobaio sensibilizados manifestou-se sob forma de nítido halo eritematoso, com bordo bem delimitado, permitindo fácil mensuração. O tamanho médio do diâmetro do eritema dos 10 animais foi de 15,7, 13,1, 9,9, 7,9 mm, respectivamente para as diluições acima indicadas. Nos cobaio normais, a injeção das mesmas diluições da "linfadenina", não causou reações dignas de nota, conforme mostra o Quadro 6.

A "linfadenização" em 40 caprinos naturalmente infectados, e portadores de lesões da linfadenite caseosa realizada com a "linfadenina" contendo 0,25 mg/ml de proteína, revelou reações no ponto de inoculação, com maior intensidade às 48 horas, em todos os animais com aumentos da espessura da dobra da pele (AEDP) variando de 1,6 a 12,2 mm, com uma média de 6,04 ± 2,87 mm (Quadro 3).

Em outro grupo de 22 caprinos doentes, foi utilizada a "linfadenina" com a concentração de 0,12 mg/ml proteína. Neste experimento também todos os animais reagiram, porém com menor intensidade com o AEDP variando de 1,4 a 9,0 mm e média de 4,74 mm (Quadro 4).

Em 40 caprinos de criação livre da linfadenite caseosa, foi testada, simultaneamente, a "linfadenina" contendo 0,25 e 0,12 mg/ml de proteína. Verificou-se que com a concentração de 0,25

mg/ml houve AEDPs entre 0,0 e 0,5 mm em 47,5% dos animais, entre 0,5 a 1,0 mm em 35,0% e apenas em 17,5% o AEDP variou entre 1,0 e 1,5 mm, com média de 0,57 ± 0,40.

Nos mesmos animais foi aplicada, simultaneamente, a "linfadenina" menos concentrada, ou seja, 0,12 mg/ml de proteína cujos resultados revelaram também que 47,5% dos animais apresentaram AEDP entre 0,0 a 0,5 mm, 40,0% entre 0,5 a 1,0 mm e apenas 12,5% entre 1,0 a 1,5 mm, com média de 0,48 ± 0,31.

DISCUSSÃO

Os alérgenos descritos por Cassamagnaghi (1931), Carne (1932), Cameron & McOmie (1940), Farid & Mahmoud (1960/61) eram constituídos por filtrados de culturas de *C. pseudotuberculosis*, incubadas a 37°C por longos períodos. Estes filtrados, além de terem tido componentes do próprio meio de cultura também continham outros produtos decorrentes do catabolismo bacteriano durante o longo período de incubação e dentre estes também toxinas. A concentração do princípio ativo não foi determinado. A falta de sensibilidade e especificidade nos testes realizados por Carne (1932) em ovinos portadores de lesões da linfadenite fez com que este autor não se visse encorajado a prosseguir suas pesquisas sobre o uso da "Preisnocardina" no diagnóstico alérgico da linfadenite.

Em um ensaio preliminar, Langenegger & Langenegger (1984) tentaram produzir uma sensitina com endoproteínas cujos resultados também não foram promissores.

No presente trabalho, os autores verificaram que foi possível extrair uma proteína solúvel em água destilada de bactérias lavadas e obtidas em cultura de *C. pseudotuberculosis* com 5 dias de incubação. Esta proteína pôde ser concentrada por precipitação com ácido tricloroacético e determinada a sua quantidade no alérgeno. A proteína, extraída segundo a descrição, não se revelou tóxica para cobaio o que permitiu usar este animal para teste de avaliação da eficácia da "linfadenina". Os testes alérgicos em caprinos oriundos de rebanhos sem linfadenite e em caprinos portadores de lesões clínicas da doença revelaram especificidade e sensibilidade alérgica adequada para o seu emprego no diagnóstico, embora neste experimento inicial tenham sido usados apenas 40 caprinos em cada lote.

Os resultados do teste alérgico com as duas "linfadeninas" em caprinos doentes e sadios permitiram concluir que a da con-

centração com 0,25 mg/ml de proteína parece ser mais adequada, revelando boa sensibilidade e suficiente especificidade.

A sensitina elaborada por Costa Filho (1978), aparentemente, baseou-se no mesmo princípio, pois em sua descrição, muito sumária, fala de uma suspensão bacteriana de *C. pseudotuberculosis*, dando a entender que foram utilizados os microrganismos (sem o meio de cultura) em suspensão aquosa em que inadvertidamente houve extração da proteína. A especificidade do teste em caprinos infectados e indenes, embora realizada com um número muito reduzido de animais foi surpreendente considerando-se que a sensitina era constituída por uma suspensão bacteriana fenolizada a 0,5%.

Agradecimentos. - O trabalho foi desenvolvido com recursos financeiros do Programa de Biotecnologia da FINEP através de convênio com a EMBRAPA. Os autores querem registrar seus agradecimentos ao Técnico de Laboratório Sr. Orlandino Gregório e ao Laboratorista Sr. José Eneas Barbosa pela efetiva e dedicada colaboração técnica prestada na realização da presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Cameron H.S. & McOmie W.A. 1940. The agglutination reaction in *Corynebacterium ovis* infection. Cornell Vet. 30:41-46.
- Carne H.R. 1932. The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagents. Aust. Vet.J.4:42-47.
- Cassamagnaghi A. 1931. Le diagnostic de la Lympho-adenite caseéuse des mouton par l'intradermo-réaction à la Preisz-Nocardine. Bull. Acad. Vét. France 4(7):330-333.
- Césari E. 1930. Sur le diagnostic de la lymphadénie caséuse par l'intradermo-réaction à la Preisz-Nocardine. Bull. Acad. Vét. France 3(6):291-295.
- Costa Filho G.A. 1977/78. Diagnóstico precoce da linfadenite caseosa dos caprinos através da intradermo-reação. An. Univ. Fed. Rural de Pernambuco, Recife, nº 2/3: 161-170.
- Costa M.D.M., Câmara, J.Q., Rocha, J.V.N. & Martinez, T.C.N. 1973. Linfadenite caseosa dos caprinos no Estado da Bahia - Distribuição geográfica da doença. Bolm Inst. Biol. Bahia, Salvador, 12(1):1-7.
- Farid A. & Mahmoud A.H. 1960/61. Primary trials on the diagnosis of Caseous Lymphadenitis in Egypt by means of intradermal inoculation of allergic material. Vet. Med. J., Giza, 7(7/8):253-258.
- Langenegger C.H. & Langenegger J. 1984. Avaliação da sensibilidade alérgica da infecção por *Corynebacterium ovis* em caprinos. An. 19º Congr. Bras. Med. Vet., Belém, Pará, p. 120.
- Renshaw H.W., Graff V.P. & Gates N.L. 1979. Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: Isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, and *Moraxella* spp from internal abscesses in emaciated ewes. Am. J. Vet. Res. 40(8):1110-1114.
- Silva F.M. 1972. Carvão dos caprinos (linfadenite caseosa) no Estado de Pernambuco. Monografia, Univ. Fed. Rural de Pernambuco, Recife.
- Train 1934. Contribution à l'étude du traitement et du diagnostic de la lymphangite ulcéreuse. Rev. Vét. Milit., Paris, 18:355-362.

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Vernonia mollissima* (Compositae) EM OVINOS E BOVINOS¹

ALDO GAVA², PAULO VARGAS PEIXOTO³, e CARLOS HUBINGER TOKARNIA⁴

ABSTRACT. - Gava A., Peixoto P.V. & Tokarnia C.H. 1987. [Experimental poisoning by *Vernonia mollissima* (Compositae) in sheep and cattle.] Intoxicação experimental por *Vernonia mollissima* (Compositae) em ovinos e bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(2):33-41. Universidade para o Desenvolvimento de Santa Catarina, Centro Agroveterinário, Av. Luiz de Camões 2090, Lages, Santa Catarina, 88500, Brazil.

The aerial parts of *Vernonia mollissima* Don, in its sprouting stage, were given experimentally to sheep and cattle. In both animal species an acute lethal poisoning was reproduced by the administration of single doses of the plant material. In cattle, additionally a subacute lethal poisoning was caused by the administration of repeated daily doses. It was not possible to induce a chronic poisoning with liver cirrhosis.

In sheep, the clinical manifestations in the acute poisoning were: anorexia, rumen atony, apathy, somnolence, a staggering gait; the animals remained for long periods in sternal-abdominal decubitus, and finally fell on their side, had tachypnea and died. Post-mortem examinations revealed in the liver areas with nutmeg appearance and others of yellowish colour, in the endocardium hemorrhages, and in the omasum, colon and rectum dried contents. Histological examinations revealed massive necrosis of the liver parenchyma.

In cattle, the clinical-pathological manifestations were also those of liver dystrophy, similar to those observed in the sheep. The clinical manifestations of the subacute poisoning in cattle were characterized by anorexia, apathy, rough hair coat, dry muzzle, constipation, frequent sternal-abdominal decubitus, absence of urination during the last days, and death. Post-mortem findings were an orange discoloration of the liver and marked perirenal oedema. Histological examinations revealed severe necrosis of the kidney tubuli and moderate necrosis of the liver parenchyma. In those calves in which chronic poisoning was tempted, and which afterwards were euthanased, only slight microscopic alterations were observed in kidney and liver. The data obtained in the experiments indicate that mortalities in sheep, which occur in southern Mato Grosso do Sul and in which symptoms and lesions analogous to those obtained experimentally are observed, may be caused by the ingestion of *V. mollissima*. On the other hand, the results of the experiments do not allow to relate in this region, possible cases of hepatic cirrhosis, to the ingestion of this plant species; but clinical cases of subacute course, with manifestations of renal disfunction, may be attributed to poisoning by *V. mollissima*.

INDEX TERMS: Poisonous plants, *Vernonia mollissima*, Compositae, plant poisoning, cattle, sheep, pathology.

SINOPSE. - Descreve-se em ovinos e bovinos um quadro clínico-patológico de evolução aguda, letal, e em bovinos, ainda um quadro de evolução subaguda, letal, pela administração experimental das partes aéreas, em fase de brotação, do subarbusto *Vernonia mollissima* Don, planta pertencente à família das Com-

postas. Não se conseguiu produzir em bovinos um quadro de intoxicação crônica com cirrose hepática.

Nos ovinos, o quadro clínico agudo foi caracterizado por anorexia, atonia do rúmen, apatia, sonolência, andar cambaleante, longa permanência em decúbito esterno-abdominal, caindo finalmente em decúbito lateral, taquipnéia e morte. A necropsia revelou áreas com aspecto de noz-moscada no fígado, intercaladas por áreas de coloração amarelada, além de hemorragias no endocárdio e ressecamento do conteúdo do folhoso, colon e reto. Os exames histopatológicos revelaram necrose maciça do parênquima hepático.

Na intoxicação aguda em bovinos, foi obtido um quadro clínico-patológico de "hepatite tóxica", semelhante ao observado nos ovinos. O quadro de intoxicação de evolução subaguda nos bovinos caracterizou-se clinicamente por anorexia, apatia, pêlos arrepiados, focinho seco, constipação, decúbito esterno-abdomi-

¹ Aceito para publicação em 15 de dezembro de 1986.

Assunto da tese-MSc em Medicina Veterinária, do primeiro autor, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1986.

² Disciplina de Anatomia Patológica, do Centro Agroveterinário (CAV) em Lages, da Universidade para o Desenvolvimento de Santa Catarina (UDESC).

³ Pesquisador bolsista, Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal (UAPNPSA), Embrapa.

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

nal freqüente, ausência de micção nos últimos dias e morte. À necropsia, o fígado tinha coloração alaranjada, e os rins, acentuado edema perirrenal. Ao exame histológico revelou-se necrose acentuada do túbulo urinífero e necrose moderada no fígado. Nos bezerros submetidos à tentativa de produzir intoxicação crônica e sacrificados no decorrer do experimento, foram observadas apenas alterações a nível microscópico, de intensidade discreta a leve, nos rins e fígado.

O conjunto desses resultados permite concluir que, casos de mortes em ovinos na região sul do Mato Grosso do Sul, com sintomas e lesões semelhantes aos obtidos experimentalmente na mesma espécie animal, podem ser atribuídos à intoxicação por *V. mollissima*. No tocante a bovinos, esses resultados não permitem relacionar casos de cirrose hepática, que venham a ser observados naquela região, à intoxicação por *V. mollissima*; no entanto, casos de evolução subaguda, com manifestações clínicas devidas a alterações renais, podem ser atribuídos a essa causa.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, *Vernonia mollissima*, Compositae, intoxicação por planta, bovinos, ovinos, patologia.

INTRODUÇÃO

Em certas regiões do Mato Grosso do Sul, bovinos morrem anualmente em grande número, com um quadro clínico-patológico de evolução aguda, caracterizado por distrofia hepática grave. Döbereiner et al. (1976) reproduziram experimentalmente esse quadro, administrando a bovinos *Vernonia mollissima* por via oral e, através de estudos realizados na região, concluíram ser essa planta subarborescente a responsável pelas mortes referidas. Nesses experimentos usaram inicialmente a planta verde fresca e, posteriormente, realizaram experimentos com a planta desidratada, verificando que esta, guardada à sombra, em sacos de pano e à temperatura ambiente, durante um ano não teve diminuída sua toxicidade. Nas mesmas regiões onde ocorrem as mortes acima mencionadas, colheram-se históricos de mortandades de natureza semelhante em ovinos, que ainda não foram estudadas.

Vernonia mollissima é uma planta hepatotóxica que ocorre no Brasil, onde são conhecidas também as seguintes: *Cestrum laevigatum* (Thorburn 1934, Döbereiner et al. 1969, Nunes 1972), *Cestrum parqui* (Riet-Correa et al. 1986), *Sesaea brasiliensis* (Andrade 1960, Canella et al. 1968, Saad et al. 1972) (família Solanaceae), *Vernonia rubricaulis* (Tokarnia & Döbereiner 1982), *V. squarrosa* (Tokarnia & Döbereiner 1983a), *Senecio brasiliensis* (Riet-Correa et al. 1983, Tokarnia & Döbereiner 1984) (fam. Compositae), *Echium plantagineum* (Mendez et al. 1985) (fam. Boraginaceae) e *Crotalaria anagyroides* (Tokarnia & Döbereiner 1983b) (fam. Leguminosae). Experimentalmente, com três delas (*Cestrum laevigatum*, *Sesaea brasiliensis* e *Senecio brasiliensis*) foi provocada tanto a intoxicação aguda com distrofia hepática grave como a intoxicação crônica com cirrose hepática, dependendo da quantidade e do tempo em que elas foram ingeridas pelos animais. Com *Cestrum parqui* e as Vernônias, somente foi provocada a intoxicação aguda, e com *Echium plantagineum* e *Crotalaria anagyroides* somente a intoxicação crônica. Porém, sob condições naturais, tem-se visto *Cestrum laevigatum*, *Sesaea brasiliensis*, *Vernonia mollissima* e *V. rubricaulis* causarem somente intoxicação aguda, e *Senecio brasiliensis* e *Echium plantagineum* provocarem somente intoxicação de evolução crônica. A ocorrência de intoxicação por *Vernonia squarrosa*, sob condições naturais, ainda não tem sido estabelecida com segurança; não há observações sobre a ocorrência da intoxicação por *Crotalaria anagyroides*.

Os propósitos deste estudo foram: a) verificar se ovinos seriam sensíveis à intoxicação aguda por *Vernonia mollissima*, e b) averiguar se essa planta seria capaz de provocar um quadro de intoxicação crônica em bovinos, incluindo cirrose hepática, quando ingerida diariamente em doses subletais durante períodos prolongados. O esclarecimento do primeiro ponto teve, como finalidade principal, averiguar se as mortes que ocorrem em ovinos na região onde existe *V. mollissima* podem realmente ser atribuídas à ação desta, e adicionalmente, verificar se ovinos poderiam servir como animais experimentais na realização de outros estudos sobre a ação tóxica da planta, bem como no isolamento e identificação de princípios tóxicos, visto serem ruminantes de porte médio e por isso menos dispendiosos. O esclarecimento do segundo ponto é importante para verificar se eventuais casos de cirrose hepática em bovinos na região de ocorrência da planta, podem ser causados por *V. mollissima*.

O trabalho foi essencialmente experimental, consistindo na administração, por via oral, das partes aéreas de *V. mollissima* desidratadas a ovinos e bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Partes aéreas de *Vernonia mollissima* Don (fam. Compositae) foram coletadas na invernoada Vahy, Fazenda Margarida, município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul. A coleta foi realizada de 3 a 6 de setembro de 1984, quando a planta estava em fase de brotação, medindo entre 10 a 15 cm (Fig. 1), e de pré-floração, com até 25 cm de altura. Uma amostra de 1 kg da planta fresca foi pesada e separada para controle da perda de peso após desidratação.

A secagem, feita à sombra e em temperatura ambiente, foi iniciada na própria fazenda e concluída nas dependências da Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal (UAPNPSA) - Embrapa, no município de Itaguaí, Rio de Janeiro. O período de desidratação à temperatura ambiente foi de aproximadamente 20 dias. Na amostra separada, constatou-se que a perda de peso foi de 75% em relação à planta verde.

Todos os experimentos foram realizados com a planta desidratada e nas dependências do Setor de Anatomia Patológica da UAPNPSA, Embrapa. Durante o experimento, os animais foram mantidos em estábulos em boxes individuais, sendo diariamente soltos em piquetes onde ficavam até aproximadamente às 10:00 h. A alimentação foi fornecida no cocho, à base de capim, cana moída, ração comercial e água à vontade. A administração da planta foi feita manualmente por via oral. Para os experimentos foram utilizados 9 ovinos com idade variando de 12 a 48 meses e 8 bovinos com idade de 14 a 30 meses.

Os ovinos receberam somente doses únicas com a finalidade de verificar se essa espécie também é sensível à intoxicação por *V. mollissima*. As doses administradas foram de 2,5, 5 e 10 g/kg de peso corporal⁴.

Em relação aos bovinos, dois receberam doses únicas de 5 e 10 g/kg de peso corporal, para comprovar a toxicidade da planta em relação à coletada por Döbereiner et al. (1976). Determinada a dose letal, que foi de 10 g/kg, iniciou-se a série de experimentos de administrações repetidas para verificar se *V. mollissima* é capaz de provocar um quadro de intoxicação crônica. Para isso, dois outros bovinos receberam 5 g/kg diariamente até manifestação de anorexia acentuada, quando foi suspensa a administração da planta, morrendo os animais em seguida. Dos quatro bovinos restantes, dois receberam 1,25 g/kg e dois 2,5 g/kg, em doses diárias durante 60 dias. Estes quatro bezerros foram pesados inicialmente e repesados semanalmente, sendo a quantidade de *V. mollissima* das doses diárias reajustadas de acordo com a variação semanal do peso. Dois desses animais, um de cada nível de dosagem, foram sacrificados na semana em que ocorreu o término da série de doses, e os outros dois ficaram em observação por mais 8 meses, sendo então sacrificados por choqueamento e sangria.

Antes da administração da planta, todos os animais foram examinados clinicamente. Naqueles utilizados em experimentos com doses únicas de 2,5, 5 e 10 g/kg (ovinos e bovinos) ou com doses diárias de 5 g/kg (bovinos), o exame clínico foi realizado duas vezes ao dia, a partir da administração. Nos bovinos utilizados nos experimentos com doses de 1,25 e 2,5 g/kg, o

⁴ Todas as doses indicadas neste trabalho correspondem ao peso da planta fresca.

Quadro 1. *Experimentos em ovinos com Vernonia mollissima, em doses únicas*

Ovino nº (SAP) ^a	Idade em meses	Peso em kg	Data do início do experimento	Dose em g/kg, correspondente à planta fresca	Total de planta administrada em gramas, correspondente à planta fresca	Intensidade dos sintomas	Início dos sintomas após início da administração	Duração dos sintomas
4485 (23379)	24	39	3.10.84	10	390	Morreu	10h30min	12h
4719 (23403)	18	35	10.11.84	10	350	Morreu	21h35min	11h30min
4733 (23430)	18	28	31.12.84	10	280	Morreu	16h30min	25h45min
4720 (23428)	15	30	31.12.84	10	300	Morreu	14h30min	4h40min
4732 (23429)	12	22	31.12.84	5	110	Morreu	22h39min	11h
4422	48	39,5	5.10.84	5	197,5	Sem sintomas		
4433	48	39	12.10.84	5	195	Sintomas leves	30h53min	53h50min
4731	15	25	3.01.85	5	125	Sintomas leves	16h37min	31h13min
4730	15	24	3.01.85	2,5	60	Sem sintomas		

^a Número de registro do material para exame histopatológico, no Setor de Anatomia Patológica da UAPNPSA, Embrapa.

exame clínico foi efetuado semanalmente. Todos os animais que morreram em consequência da intoxicação ou por sacrifício foram necropsiados, coletando-se, para estudos histológicos, fragmentos de coração, pulmões, fígado, rins, pâncreas, baço, linfonodos, tubo digestivo e sistema nervoso central; esses materiais foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados em seções de 6 µm e corados com hematoxilina-eosina. Fragmentos de fígado e rins foram cortados por congelção e corados com

Sudan III (Pallaske & Schmidel 1959). Cortes de fígado foram ainda submetidos à técnica para coloração de fibras colágenas com azul de Mallory (Mallory 1938).

RESULTADOS

Experimentos em Ovinos

Os principais dados dos experimentos com *Vernonia mollissima* em ovinos constam dos Quadros 1 e 2.

Todos os ovinos que receberam *V. mollissima* em dose única de 10 g/kg morreram, ocorrendo a morte entre 19h10min e 42h15min após a administração. Os sintomas foram de anorexia, apatia, sonolência, atonia de rúmen e constipação, permanecendo os animais em decúbito esterno-abdominal durante boa parte do tempo. Ao se levantarem, os ovinos tinham andar rígido, caminhando com os membros afastados entre si, apoiavam a cabeça na parede e apresentavam taquipnéia. Finalmente, deitavam-se em posição lateral, tinham contrações musculares e morriam entre uma e duas horas após entrarem em decúbito lateral.

Dos ovinos que ingeriram doses únicas de 5 g/kg, apenas um (nº 4732) morreu, sobrevivendo a morte 33h39min após a administração da planta; dois outros, que também receberam 5 g/kg (nºs 4433 e 4731), tiveram leves modificações clínicas, destacando-se anorexia, apatia e atonia moderada do rúmen; o quarto ovino que recebeu 5 g/kg (nº 4422) e outro que recebeu 2,5 g/kg (nº 4730) não demonstraram alterações clínicas.

Na necropsia, as lesões foram bastante uniformes em todos os ovinos, destacando-se petéquias no epicárdio, mais frequentemente no sulco coronário, e sufusões no endocárdio do ventrículo esquerdo; o fígado apresentava tanto externamente como na superfície de corte áreas com aspecto de noz-moscada intercaladas por áreas de cor amarela, mais evidentes na região esquerda do órgão (Fig. 2); vesícula biliar com edema da parede; mucosa do intestino delgado e ceco com hiperemia moderada; cólon e reto com conteúdo ressequido envolto por muco com estrias de

Quadro 2. *Alterações histopatológicas no fígado de ovinos intoxicados experimentalmente por Vernonia mollissima*

Ovino nº (SAP) ^a	Fígado	
	Necrose das células hepáticas	Congestão centrolobular
4485 (23379)	+++ ^b	++
4719 (23403)	+++	++(+)
4733 (23430)	+++	++
4720 (23428)	+++	++
4732 (23429)	++(+)	++

^a Número de registro do material para exame histopatológico, no Setor de Anatomia Patológica da UAPNPSA, Embrapa.

^b +++ Lesão acentuada; ++(+) menos acentuada; + + lesão moderada.

sangue; a mucosa desses dois segmentos estava com hemorragias sob forma de sufusões.

O exame histológico, em todos os casos letais, revela necrose de coagulação de todo o parênquima hepático, restando apenas alguns hepatócitos na periferia do lóbulo; há congestão centrolobular moderada a acentuada (Fig. 3).

Experimentos em Bovinos

Os principais dados sobre os experimentos em bovinos constam dos Quadros 3 e 4. Pormenores desses experimentos são fornecidos a seguir.

Administração de doses únicas de 5 e 10 g/kg a dois bovinos

Bovino 4451, fêmea, mestiça holandês, com 24 meses de idade e pesando 157 kg, recebeu em 11.10.84, 5 g/kg, de *V. mollissima* em dose única de 785 gramas. Não apresentou alterações clínicas.

Bovino 4714, macho, da raça holandesa, com 30 meses de idade e pesando 179 kg, recebeu em 26.10.84, às 10:35h, 10 g/kg de *V. mollissima* em dose única de 1,790 kg. Vinte e uma horas após o início da administração,

foram observados os primeiros sintomas que consistiram em apatia, pêlo arrepiado, salivação, leves tremores musculares na coxa e no flanco, narinas secas, anorexia, atonia de rúmen, constipação, muco e estrias de sangue nas fezes, permanecendo, a maior parte do tempo, em decúbito esterno-abdominal. Quando em pé, o animal se locomovia com dificuldade, membros afastados entre si, e, quando parado, procurava apoiar a cabeça contra a parede. No dia 29.10.84, às 22:30h, caiu ao chão, com respiração ofegante em forma de soluços, e tremores da cabeça; o animal fez movimentos de pedalagem, tomou posição ortopnéica, morrendo em 30.10.84 às 1:17h. – Os achados de necropsia consistiram em equimoses ao longo do sulco coronário esquerdo e sufusões no endocárdio do ventrículo esquerdo; equimoses no epíplao e na serosa do omaso; edema moderado no mesentério; omaso com conteúdo seco; intestino delgado e ceco com conteúdo líquido, de cor avermelhada, com hiperemia e algumas equimoses na mucosa; cólon e reto com conteúdo ressecado, envolto por muco e estrias de sangue; áreas da superfície do fígado manifestavam nitidez do desenho lobular, cujos centros tinham coloração vermelha e a periferia era de cor cinza-amarelado. Em outras áreas, este aspecto era menos nítido, predominando coloração amarelada, principalmente na parte esquerda do órgão. Ao corte repetia-se o mesmo aspecto. Nos rins, algumas equimoses na pelve. – Os exames histológicos (SAP 23392) revelam, no fígado, áreas com congestão e desaparecimento dos hepatócitos na região centrolobular. Os hepatócitos da periferia desses lóbulos e a totalidade dos situados em áreas sem congestão apresentavam tumefação muito acentuada com aspecto esponjoso-vesicular, frequentemente rompidos e, em geral, com citoplasma representado por pou-

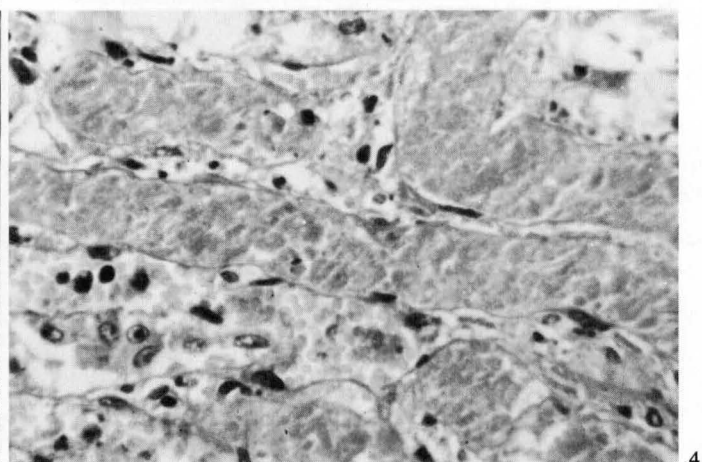


Fig. 1. Brotação, após queimada, de *Vernonia mollissima*, no mês de setembro. Invernada na Fazenda Margarida, município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul.

Fig. 3. Necrose maciça do parênquima hepático, na intoxicação experimental aguda por *V. mollissima* (Ovino 4485, SAP 23379). HE, obj. 16.

Fig. 2. Fígado com áreas com aspecto de noz-moscada, intercaladas por áreas amarelas, na intoxicação aguda por *Vernonia mollissima* (Ovino 4719).

Fig. 4. Necrose maciça dos túbulos uriníferos em bovino que recebeu doses diárias de 5 g/kg durante 10 dias (Bov. 4497, SAP 23380). HE, obj. 16.

Quadro 3. Experimentos em bovinos com *Vernonia mollissima*, em doses únicas e repetidas

Bovino nº (SAP) ^a	Idade em meses	Peso inicial em kg	Peso final em kg	Início da administração	Dose em g/kg correspondente à planta fresca e número das administrações diárias	Peso total da planta administrada em kg, correspondente à planta fresca	Intensidade dos sintomas	Início dos sintomas após início da adminis- tração	Duração dos sintomas
<i>Administração de doses únicas de 5 e 10 g/kg</i>									
4451	24	157		11.10.84	5 x 1	0,785	Sem sintomas		
4714 (23392)	30	179		26.10.84	10 x 1	1,790	Morreu em 30.10.84	21 horas	65h42min
<i>Administração de doses repetidas em 5 g/kg</i>									
4497 (23380) (23381)	18	128	123,5	27.09.84	5 x 10	6,400	Morreu em 9.10.84	6 dias	8 dias
4722 (23437)	18	167,5	150	3.1.84	5 x 11	9,212	Morreu em 16.1.85	8 dias	6 dias
<i>Administração de doses repetidas de 2,5 g/kg</i>									
4489 (23419)	14	117	110	27.9.84	2,5 x 60	17,550 - 1,440 = 16,110 ^b	Sintomas leves; sacr. em 1.12.84 no fim das administrações	8 dias	10 dias
4448 (23593) (23594) (23595)	24	144,5	196	27.10.84	2,5 x 60	21,675 + 1,647 = 23,322	Sem sintomas, sacr. em 24.8.85, 8 meses após o fim das administrações		
<i>Administração de doses repetidas de 1,25 g/kg</i>									
4498 (23422)	15	128,5	161	11.10.84	1,25 x 60	9,637 + 414 = 10,051	Sem sintomas, sacr. em 15.12.84 no fim das administrações		
4716 (23604) (23605) (23606)	24	196	220	15.11.84	1,25 x 60	14,700	Sem sintomas; sacr. em 14.9.85, 8 meses após o fim das administrações		

^a Número de registro do material para exame histopatológico no Setor de Anatomia Patológica da UAPNPSA, Embrapa.

^b Correspondente à quantidade dada a mais ou a menos, de *V. mollissima*, de acordo com as variações semanais do peso do animal.

cos grânulos pequenos (Sudan III positivo para gordura). Muitas dessas células não têm núcleo, outras têm núcleos com sua cromatina condensada e seus contornos irregulares. Nos espaços porta e às vezes entre os lóbulos, há proliferação leve a moderada de vias biliares, com distribuição variável, mais acentuada nas áreas onde há congestão. Nos rins, na cortical e junção córtico-medular, grande parte dos túbulos possui células epiteliais tumefeitas, com citoplasma finamente granular e escasso, freqüentemente de aspecto vesicular (Sudan III negativo para gordura). Em alguns túbulos da cortical, as células epiteliais têm seu núcleo em picnose; às vezes há desaparecimento da cromatina e lise celular. Também na cortical evidencia-se uma moderada dilatação tubular.

Administração de doses diárias de 5g/kg a dois bovinos

Nos dois bovinos que receberam 5 g/kg da planta diariamente, a perda total do apetite ocorreu após a 10^a e 11^a doses.

Bovino 4497, mestiço holandês, macho, com 18 meses de idade e pesando 128 kg, recebeu diariamente 5 g/kg de *V. mollissima* durante 10 dias, totalizando 6,400 kg. O experimento teve início em 27.9.84. Após completar a 6^a dose (em 2.10.84), foram observados os primeiros sintomas, que eram diminuição do apetite, constipação, focinho seco e apatia. Em 6.10.84, após receber a 10^a e última dose, os sintomas se agravaram, com perda total do apetite, atonia do rúmen, ventre abaulado, micção pouco freqüente, o animal permanecendo a maior parte do tempo deitado, com tremores musculares generalizados e extremidades do corpo frias, morrendo no dia 9.10.84

às 6:45h. – Os achados de necropsia consistiram em congestão e presença de petéquias na traquéia, acúmulo de líquido avermelhado na cavidade torácica (aprox. 1 litro) e marrom-claro na cavidade abdominal (aprox. 1 litro), edema na parede do diafragma, coração com petéquias junto ao epicárdio do ventrículo direito e hemorragias difusas no endocárdio do ventrículo esquerdo, omaso com conteúdo ressecado, ceco e porção inicial do cólon com conteúdo líquido e com congestão e hemorragias em forma de estrias na sua mucosa, porção final do cólon e reto com conteúdo seco envolto por muco e sangue, fígado, tanto na superfície como ao corte, com áreas claras e outras escuras de contornos irregulares lembrando noz-moscada, diferenciando-se o lado esquerdo por apresentar coloração alaranjada, rins com acentuado edema perirrenal, um pouco mais acentuado no rim esquerdo. – Os exames histológicos (SAP 23380-81) revelam, no fígado, naquelas áreas que na macroscopia lembravam aspecto de noz-moscada, congestão centrolobular acentuada, atingindo quase todo o lóbulo com desaparecimento de grande parte dos hepatócitos. Das células restantes, muitas manifestam cariorrexia ou ausência do núcleo e citoplasma bem eosinófilo; hiperplasia moderada das vias biliares. As áreas que pela macroscopia tinham coloração alaranjada, revelam dissociação difusa dos cordões hepáticos de intensidade leve a moderada, com vacuolização difusa dos hepatócitos, mais acentuada na região intermediária (Sudan III positivo para gordura). De maneira geral, os núcleos são vesiculares, com sua cromatina condensada na periferia; em alguns pontos as células hepáticas sofreram necrose focal apresentando seus núcleos em cariorrexia, muitas sem núcleos ou estes em fase de dissolução. Nos rins, necrose de coagulação atingindo parte dos túbulos, mostrando sua luz preenchida por massa eosinófila, delimitada apenas pela membrana basal (Fig. 4); em alguns túbulos, na junção córtico-medular, são

Quadro 4. Alterações histopatológicas no fígado e nos rins dos bovinos intoxicados experimentalmente por *Vernonina mollissima*

Bovino n ° (SAP) ^a	Fígado				Presença de tecido conjuntivo colágeno	Rins	
	Necrose/lise de células hepáticas	Degeneração gordurosa de hetatócitos	Congestão centrolobular	Proliferação das vias biliares		Necrose de células epiteliais na cortical	Dilatação de túbulos uriníferos
<i>Administração de dose única de 10 g/kg</i>							
4714 (23392)	++ ^b	++(+)	++(+)	+(+)	—	+	++
<i>Administração de doses repetidas de 5 g/kg</i>							
4497 (23380) (23381)	++	++	++	++	—	+++	—
4722 (23437)	+	++	+	+	—	++	++
<i>Administração de doses repetidas de 2,5 g/kg</i>							
4489 (23419)	(+)	—	—	(+)	—	—	—
4448 (23593) (23594) (23595)	(+)	—	—	+	+	—	—
<i>Administração de doses repetidas de 1,25 g/kg</i>							
4498 (23422)	—	—	—	—	—	—	—
4716 (23604) (23605) (23606)	—	—	—	(+)	(+)	—	—

^a Número de registro do material para exame histopatológico no Setor de Anatomia Patológica da UAPNPSA, Embrapa.

^b +++ Lesão acentuada; ++ moderada; + leve; (+) discreta; – ausência de lesões.

vistas gotículas hialinas com localização intracitoplasmática, e na medular, alguns túbulos têm sua luz preenchida por cilindros hialinos.

Bovino 4722, mestiço holandês, macho, com 18 meses de idade e pesando 167,5 kg, recebeu diariamente *V. mollissima* em doses de 5 g/kg durante 11 dias, no total de 9,212 kg. O experimento teve início em 3.1.85; após a 8^a dose (em 10.1.85) foram observados os primeiros sintomas, que foram: apatia, diminuição do apetite, pêlo arrepiado, leve constipação e foinho seco. Os sintomas se agravaram e a administração da planta foi suspensa após a 11^a dose (em 13.1.85), quando houve perda total do apetite, atonia do rúmen, constipação com fezes envoltas por muco, ventre abaulado, micção pouco freqüente, decúbito lateral, ranger de dentes, taquipnéia, pequenos movimentos de pedalagem, intercalados por momentos de calma, e morte em 16.1.85 às 18:10h. – Os achados de necropsia foram acúmulo de líquido avermelhado na cavidade torácica (aprox. 1 litro) e na cavidade abdominal (aprox. 2 litros), no coração, petéquias e equimoses distribuídas pelo epicárdio, sendo mais acentuadas junto ao sulco coronário, e hemorragias na maior parte do endocárdio do ventrículo esquerdo, omaso e abomaso com edema moderado da parede, hiperemia da mucosa do intestino delgado, ceco e cólon com conteúdo líquido levemente avermelhado com acentuada hiperemia e hemorragias lineares na mucosa, superfície do fígado

com coloração castanho-alaranjada, mais acentuada na parte esquerda, e em algumas áreas mais do lado direito, desenho lobular, com ponto vermelho-escuro no centro dos lóbulos hepáticos, e periferia acinzentada, edema da parede da vesícula biliar, edema perirrenal acentuado, com pontilhado vermelho na superfície renal e acentuada hiperemia da medular. – Os exames histológicos (SAP 23437) revelam, no fígado, congestão centrolobular de intensidade fraca, e leve necrose dos hepatócitos no centro dos lóbulos caracterizada por aumento da eosinofilia de seu citoplasma e condensação da cromatina de seu núcleo. Também no centro dos lóbulos, há vacuolização moderada de hepatócitos (Sudan III positivo para gordura). Essas lesões são vistas em menor grau na zona intermediária e na periferia; há leve proliferação das vias biliares. Boa parte das células do parênquima hepático apresentam gotas hialinas em seu citoplasma. Nos rins, algumas células dos túbulos têm os contornos celulares pouco nítidos com a cromatina dos núcleos condensada na sua periferia, às vezes os núcleos em cariorrexia e lise. Intercalando-se com estes túbulos encontram-se outros túbulos com necrose de coagulação, caracterizada por uma massa eosinofílica, limitada apenas pela membrana basal. Na junção cortico-medular, grupos de túbulos estão preenchidos por gotas hialinas; dilatação moderada de grupos de túbulos na cortical, e presença de cilindros hialinos em quantidade moderada na medular.

Administração de doses diárias de 2,5 e 1,25 g/kg a quatro bovinos durante 60 dias

Bovino 4489, mestiço, macho, com 14 meses de idade e pesando 117 kg, recebeu diariamente 2,5 g/kg de *V. mollissima* durante 60 dias, somando 16,110 kg, de 27.9 a 25.11.84. Ao completar-se a 8ª dose (4.10.84) o animal apresentou leve anorexia e constipação. Esses sintomas permaneceram por aproximadamente 10 dias, desaparecendo por completo após a 22ª dose. Em 1.12.84, semana em que se completaram as 60 doses, o animal foi sacrificado. – À necropsia verificou-se, no fígado, tanto na superfície como ao corte, um fino pontilhado acinzentado, de distribuição difusa. Os rins também tinham na superfície um pontilhado cinza, com distribuição difusa, e ao corte havia estriações acinzentadas. – Os exames histológicos (SAP 23419) revelam, no fígado, aumento de volume dos hepatócitos, parte dos quais fortemente corada pela eosina, e núcleo com cromatina condensada e de contorno irregular. Em parte dos lóbulos as células hepáticas centrolobulares estão afastadas entre si, algumas sem núcleo, outras com núcleo em desaparecimento; as vias biliares apresentam discreta hiperplasia das células epiteliais. Nos rins, junto à cortical, pequenos focos de proliferação de fibroblastos associados à proliferação de pequena quantidade de tecido colágeno.

Bovino 4448, mestiço holandês, com 24 meses de idade e pesando 144,5 kg, recebeu diariamente 2,5 g/kg de *V. mollissima* durante 60 dias, no total de 23,322 kg. As administrações iniciaram-se em 27.10.84 e terminaram em 26.12.84. O animal não apresentou alterações clínicas, ficando em observação durante 8 meses após o término da administração, sendo sacrificado em 24.8.84. – A necropsia revelou, no fígado, superfície pálida, com desenho de arborização, caracterizado por fina rede esbranquiçada e pequeníssimos pontos brancos, com distribuição difusa; muitos pontos vermelhos subcapsulares com diâmetro de 1 mm. A região esquerda do órgão manifestou consistência um pouco aumentada e espessura mais fina que o normal e a superfície de corte apresentava-se apenas com aspecto mais pálido. – Pelos exames histológicos (SAP 23593-95) observam-se, no fígado, presença de tecido colágeno com localização subcapsular ou centrolobular e mais raramente nos espaços porta; aumento da eosinofilia dos hepatócitos da periferia e, em menor grau, na região centrolobular; muitos hepatócitos com núcleo grande e cromatina em alguns pontos fortemente corados em azul; degeneração albuminosa granular moderada, com distribuição difusa; algumas células com núcleo em desaparecimento; hiperplasia leve das vias biliares nos espaços porta, às vezes com penetração no parênquima; pequenos e raros focos de necrose de células hepáticas, caracterizada por forte eosinofilia de seu citoplasma e picrose acentuada, e de permeio a essas células, leve infiltrado histiocitário; em alguns desses focos observa-se dilatação dos sinusóides e presença de pequena quantidade de hemácias; raras e pequenas áreas de telangiectasia são vistas, bem como uma ativação moderada das células de Kupffer. No rim, espessamento leve da cápsula de Bowman associada à presença de pequena quantidade de tecido colágeno no tufo glomerular.

Bovino 4498, mestiço holandês, macho, com idade de 15 meses e pesando 128,5 kg, recebeu diariamente 1,25 g/kg de *V. mollissima* durante 60 dias, totalizando 10,051 kg. A administração da planta teve início em 11.10.84 e conclusão em 10.12.84. O animal não mostrou nenhum sintoma de intoxicação, sendo sacrificado em 15.12.84, na semana em que se completaram as 60 doses. – Através da necropsia e histopatologia (SAP 23422) não foram observadas lesões significativas.

Bovino 4716, holandês, macho, com 24 meses de idade e pesando 196 kg, recebeu diariamente 1,25 g/kg de *V. mollissima*, durante 60 dias, no total de 14,700 kg. A administração da planta foi efetuada de 15.11.84 a 13.1.85, ficando o animal em observação durante 8 meses após a última administração. Nunca mostrou sinais de intoxicação. Foi sacrificado em 14.9.85. – À necropsia foi verificado que o fígado, na superfície como ao corte, estava levemente pálido com diversas manchas vermelhas com diâmetro de 1 a 2 mm. – Os estudos histológicos (SAP 23604-06) revelam no fígado, degeneração albuminosa granular nos hepatócitos, de intensidade moderada a acentuada e com distribuição difusa. Os hepatócitos da região centrolobular e da periferia têm seu citoplasma corado mais intensamente pela eosina, e o núcleo com cromatina condensada e de contorno irregular. Nos espaços porta, presença de tecido colágeno, em grau discreto, além de discreta proliferação das vias biliares.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Na presente série de experimentos foi obtido, em ovinos, pela administração de doses únicas de *Vernonia mollissima*, um quadro de intoxicação aguda, letal, nos quatro animais que ingeriram 10 g/kg e em um dos quatro que ingeriram 5 g/kg da planta. O quadro clínico-patológico nos ovinos foi muito semelhante ao relatado por Döbereiner et al. (1976) para bovinos com intoxicação de evolução aguda, e também observado no presente estudo. É bem provável que as mortes que ocorrem em ovinos no Mato Grosso do Sul no mesmo período das observadas em bovinos sejam também causadas por *V. mollissima*. Falta verificar o quadro clínico-patológico da intoxicação natural em ovinos.

Foi produzido em um bovino um quadro de intoxicação aguda, letal, pela administração de *V. mollissima* em dose única de 10 g/kg, com manifestações clínico-patológicas devidas principalmente às propriedades hepatotóxicas da planta, o que está de acordo com o descrito por Döbereiner et al. (1976).

Foi observado em dois bovinos um quadro de intoxicação de evolução subaguda, também letal, pela administração de doses diárias de 5 g/kg da planta durante 10 a 11 dias, no qual predominaram lesões renais devidas às propriedades nefrotóxicas da planta, o que ainda não tinha sido descrito.

Nos quatro bovinos que receberam doses diárias de 2,5 e 1,25 g/kg da planta durante 60 dias, só um adoeceu leve e passagieramente, e os achados patológicos, quando sacrificados logo após o fim da administração da planta ou 8 meses após, foram somente discretas e leves alterações hepáticas e renais.

A ocorrência da intoxicação por *V. mollissima* em bovinos sob condições naturais, já foi estudada no Mato Grosso do Sul (Döbereiner et al. 1976). Porém, a intoxicação de evolução subaguda em bovinos, sob condições naturais, ainda não foi constatada. É possível que também ocorra, pois o período durante o qual os bovinos precisam ingerir a planta para desenvolver esse quadro é relativamente curto (10 a 11 dias) e corresponde à fase de brotação da planta e maior escassez de pastagem, condições essas necessárias para que ocorram mortandades em bovinos nessa região. O diagnóstico diferencial dessa intoxicação de evolução subaguda em relação à intoxicação aguda pela mesma planta não seria difícil, em virtude do predomínio das alterações renais muito graves e de fácil interpretação, na intoxicação subaguda.

Nos experimentos realizados não foi obtido um quadro de intoxicação crônica com cirrose hepática; *V. mollissima*, dessa maneira, difere de outras plantas hepatotóxicas, em que se obteve esse quadro pela administração repetida da planta, especialmente de *Senecio brasiliensis* (Riet-Correa et al. 1983, Tokarnia & Döbereiner 1984), *Echium plantagineum* (Méndez et al. 1985) e *Crotalaria anagyroides* (Tokarnia & Döbereiner 1983b) e *Cestrum laevigatum* (Döbereiner et al. 1969). Quantidades de *Senecio brasiliensis* equivalentes às administradas de *V. mollissima* (75 a 150 g/kg) causaram intoxicação crônica com cirrose hepática (Tokarnia & Döbereiner 1984). A título de comparação, é oportuno lembrar que, com *Echium plantagineum* foi produzida intoxicação crônica com cirrose em um bovino pela administração do total de 220 g/kg durante período de 80 dias, e em outro pela administração do total de 320 g/kg durante período de 69 dias (Méndez et al. 1985). Com *Crotalaria anagyroides*, intoxicação crônica com cirrose hepática foi produzida em seis bovinos pela administração de quantidades que variaram de 55,8 g/kg em dose única até 294,8 g/kg em 12 dias (Tokarnia & Döbereiner 1983b), e com *Cestrum laevigatum*, a intoxicação crônica com cirrose hepática foi produzida em um bovino pela administração do total de aproximadamente 200 g/kg da planta durante período de 49 dias,

e em outro pela administração de aproximadamente 45 g/kg em período de 26 dias (Döbereiner et al. 1969).

Levando-se em consideração esses dados e, ainda mais, que doses diárias maiores que as dadas na tentativa de causar intoxicação crônica (maiores que 2,5 g/kg), causaram quadro de intoxicação aguda (10 g/kg x 1) ou subaguda (5 g/kg x 10 a 11), e, adicionalmente, que a brotação de *V. mollissima* não pode ser ingerida durante período maior sob condições naturais – pois a planta amadurece e perde em toxidez e também a sua palatabilidade – *V. mollissima* não pode ser incriminada como causa de eventuais mortes com cirrose hepática em bovinos nas regiões de sua ocorrência.

O problema da intoxicação por *V. mollissima* só tem sido estudado na região do Mato Grosso do Sul. Sua brotação ocorre entre fins de agosto e início de setembro, principalmente após a queima dos campos e início do período de chuvas. O período de rebrota dessa planta coincide com as mortandades em bovinos ocorridas na região e citadas por Döbereiner et al. (1976), e de consideráveis mortandades em ovinos, de acordo com os históricos colhidos.

Porém, sabe-se que *V. mollissima* não ocorre somente no Mato Grosso do Sul, tendo já sido identificada no Estado do Paraná e Rio Grande do Sul (Coelho 1985). Nessa região não houve ainda constatação de casos de intoxicação por essa planta, nem em bovinos, nem em ovinos. Há necessidade de se verificar, através da coleta de históricos, e sobretudo de necropsias e exames histopatológicos, se ocorre a intoxicação nessa região. Será necessário pensar nas duas possibilidades, isto é, na intoxicação de evolução aguda devida à ação hepatotóxica da planta e na evolução subaguda devida à sua ação nefrotóxica. Nessa região será preciso fazer o diagnóstico diferencial com a intoxicação causada por outra planta do mesmo gênero, *Vernonia squarrosa*, que foi estudada no Rio Grande do Sul e que pode causar também intoxicação aguda com lesões hepáticas e intoxicação de evolução subaguda com predominância de lesões renais (Tokarnia & Döbereiner 1983a).

Tanto em Mato Grosso do Sul como na Região Sul do Brasil, deve-se, sempre, ao estabelecer diagnóstico de intoxicação aguda por *V. mollissima*, pensar no diagnóstico diferencial com a intoxicação aguda por plantas do gênero *Cestrum*; no Mato Grosso do Sul por *Cestrum laevigatum* (Döbereiner et al. 1969) e na Região Sul por *Cestrum parqui* (Riet-Correa et al. 1986). Naturalmente o mais importante nesse diagnóstico diferencial é verificar qual das plantas existe nos pastos onde ocorreram as mortes. Não há necessidade de preocupação com as outras plantas hepatotóxicas do Brasil, como sejam: *Sesaea brasiliensis*, que não ocorre na Região Centro-Oeste, *Vernonia rubricaulis*, que ocorre na Região Centro-Oeste, mas só no pantanal, onde por sua vez não ocorre *V. mollissima*; também não é preciso haver preocupação com *Senecio brasiliensis* e *Echium plantagineum*, que são plantas tóxicas da Região Sul, ou com *Crotalaria anagyroides*, cuja distribuição não é bem conhecida, as quais apesar de experimentalmente poderem causar quadro de intoxicação aguda, sob condições naturais causam, reconhecidamente, só intoxicação crônica com cirrose hepática, quadro que, como foi visto, não pôde ser produzido na experimentação com *V. mollissima* e que provavelmente não ocorre espontaneamente.

Em relação ao quadro nefrotóxico produzido pela ingestão de *V. mollissima* na intoxicação de evolução subaguda, é importante observar que os achados de necropsia, e sobretudo as alterações histopatológicas dos rins, são muito semelhantes aos observados na intoxicação por outras plantas nefrotóxicas conhecidas no Brasil, ou seja, por *Thilao glaucocarpa* (Tokarnia et al.

1981), *Dimorphandra mollis* (Tokarnia & Döbereiner 1967; Santos 1973), *Dimorphandra gardneriana* (Döbereiner et al. 1985). Dessas, somente *D. mollis* ocorre na Região Centro-Oeste, e nenhuma dessas espécies na Região Sul do Brasil. *D. mollis* tem o mesmo habitat de *V. mollissima*, tendo sido vista nas mesmas invernações onde esta ocorre. *D. mollis* é uma árvore pertencente à família das leguminosas cujas favas amadurecem na época de seca, quando caem ao chão, onde são procuradas e avidamente ingeridas pelos bovinos e talvez também pelos ovinos. Tokarnia & Döbereiner (1967), através da experimentação em bovinos, demonstraram que essas favas, quando ingeridas na proporção de 25 g/kg, de uma só vez, causam doença grave e a morte dos animais. Viram também que quantidades iguais ou maiores, quando subdivididas em 10 doses diárias, não causaram o aparecimento de sintomas de intoxicação. A evolução dessa intoxicação era subaguda, na maioria dos casos em torno de 14 dias. Os principais sintomas foram fezes envoltas por muco e com estrias de sangue e até coágulos sangüíneos. Os achados de necropsia mais importantes eram hemorragias no trato digestivo e focos de congestão nos rins; os exames histológicos revelaram, em todos os casos, lesão renal, consistindo em necrose por coagulação dos túbulos uriníferos contornados proximais e presença de cilindros hialinos nas porções distais dos túbulos uriníferos. Dessa maneira, no Mato Grosso do Sul, ao verificar-se um quadro clínico-patológico de evolução subaguda em que se destacam lesões renais, convém dar muita atenção ao diagnóstico diferencial entre as intoxicações por *V. mollissima* e *D. mollis*. Essas considerações se referem principalmente aos bovinos; em relação aos ovinos, não se sabe ainda se a ingestão de doses repetidas subletais de *V. mollissima* também causa um quadro de intoxicação em que predominem alterações renais.

Agradecimentos. - Agradecemos à Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal (UAPNPSA) da Embrapa, especialmente ao Dr. Jerome Langenegger, pela oportunidade de realizar os experimentos em suas dependências; ao Setor de Anatomia Patológica da UAPNPSA-Embrapa, em Itaguaí, em especial ao Dr. Jürgen Döbereiner, pelo apoio; ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte da Embrapa em Campo Grande, MS, em especial ao Dr. Ivan Valadão Rosa, pelo auxílio na coleta de *Vernonia mollissima*; ao proprietário da Fazenda Margarida, Sr. Pedro Dório Passos, e seus administrados, pela ajuda na coleta da planta; à Dra. Graziela Maciel Barroso, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pela identificação botânica da planta.

REFERÊNCIAS

- Andrade S.C. 1960. Estudos sobre toxicidade de *Sesaea brasiliensis* Toledo. Arqs Inst. Biológico, S. Paulo, 27: 191-196.
- Canella C.F.C., Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1968. Intoxicação por *Sesaea brasiliensis* Toledo em bovinos. Pesq. Agropec. Bras. 3: 333-340.
- Coelho M.N. 1985. Inf. pessoal. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H. & Canella C.F.C. 1969. Intoxicação por *Cestrum laevigatum* Schlecht., a causa de mortandades em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. Pesq. Agropec. Bras. 4: 165-193.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H. & Purisco E. 1976. *Vernonia mollissima*, planta tóxica responsável por mortandades de bovinos no sul de Mato Grosso. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet. 11: 49-58.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H., Gava A. & Consorte L.B. 1985. Intoxicação experimental em bovinos pela fava de *Dimorphandra gardneriana* (Leg. Caesalpinoideae). Pesq. Vet. Bras. 5(2): 47-51.
- Mallory F.B. 1938. Pathological Technique. Saunders, Philadelphia.
- Méndez M.C., Riet-Correa F., Schild A.L., Garcia J.T.C. & Oliveira J.A.F. 1985. Intoxicação por *Echium plantagineum* (Boraginaceae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 5(2): 57-64.

- Nunes L.P. 1972. Intoxicação experimental de bovinos por *Cestrum laevigatum* Schlecht. I. Sinais clínicos. II. Alterações no sangue, líquido cefaloraquiano e urina. III. Alterações anátomo e histopatológicas. Tese-Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 40 p.
- Pallaske G. & Schmidel E. 1959. Pathologisch-histologische Technik. Paul Parey, Berlin.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C., Oliveira J.A., Gil-Turnes C. & Gonçalves A. 1983. Laboratório Regional de Diagnóstico. Relatório de atividades e doenças da área de influência no período 1978/1982. Pelotas, RS. 98 p.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C. & Pinheiro M.E. 1986. Intoxicação por *Cestrum parqui* (Solanaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 6(4): 111-115.
- Saad A.D., Alencar Filho A.R., Andrade S.O. & Aguiar A.A. 1972. Intoxicação experimental de caprinos, ovinos e pombos por *Sessea brasiliensis*. Revta Med. Vet., Rio de J., 8(1): 27-51.
- Santos F.C.C. 1973. Intoxicação experimental de bovinos pela "fava" de *Dimorphandra mollis* Benth. Tese-Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 37 p.
- Thorburn G.A. 1934. Chase Valley Disease. *Cestrum laevigatum* Schlecht., its toxic effects on ruminants. Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind. 2: 667-679.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1967. Intoxicação experimental pela fava da "faveira" (*Dimorphandra mollis* Benth.) em bovinos. Pesq. Agropec. Bras. 2: 367-373.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J., Canella C.F.C., Couceiro J.E.M., Silva A.C.C. & Araujo F.V. 1981. Intoxicação de bovinos por *Thilsea glaucocarpa* (Combretaceae), no nordeste do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 1(4): 111-132.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1982. Intoxicação de bovinos por *Vernonia rubricaulis* (Compositae) em Mato Grosso. Pesq. Vet. Bras. 2(4): 143-147.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1983a. Intoxicação experimental por *Vernonia squarrosa* (Compositae) em ovinos e bovinos. Pesq. Vet. Bras., 3(2): 45-52.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1983b. Intoxicação experimental por *Crotalaria anagyroides* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 3(4): 115-123.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1984. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 4(2): 39-65.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE IMUNOELETROSMOFORESE, SORONEUTRALIZAÇÃO E MICROIMUNODIFUSÃO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE AUJESZKY¹

PAULO M. ROEHE², HERMANN E. A. BRUCHMANN², LILIANE G. OLIVEIRA², ELIANE V. BANGEL², RICARDO M. MARTINS² e TELMO VIDOR²

ABSTRACT.- Roehé P.M., Bruchmann H.E.A., Oliveira L.G., Bangel E.V., Martins R.M. & Vidor T. 1986. [Comparison of immunoelectromorphoresis, serum neutralization and immunodiffusion in the serological diagnosis of Aujeszky's disease]. Comparação entre os testes de imunoelctrosmoforesse, soroneutralização e imunodifusão no diagnóstico sorológico da doença de Aujeszky. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(2):43-46. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS 90000, Brazil.

In an attempt to determine the most suitable screening test for the identification of antibodies to Aujeszky's disease virus in large scale, immunoelectromorphoresis (IEOP), serum neutralization in microtitre plates (SN) and agar gel immunodiffusion (MID) were adapted to our working conditions and compared. For the comparison between IEOP and SN, 575 field sera of swine from the states of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul were used. The IEOP detected 358 (100%) positive sera, whereas SN detected 293 (81,84%) positives and 35 (9,78%) negatives. In 30 (8,38%) samples no results could be obtained with SN due to contamination or cell culture toxicity.

In 217 (100%) samples negative by IEOP, 199 (91,7%) were negative by SN. The remainder 18 (8,29%) allowed no SN result.

MID was included in the comparison by testing 386 sera by the three methods. From 285 (100%) IEOP positive sera, SN detected 226 (79,3%) positives, 31 (10,9%) negatives and 28 (9,8%) without result. MID detected 193 (67,7%) positives, 84 (29,5%) negatives and 8 (2,8%) allowed no conclusive result. In 101 (100%) IEOP negative sera, all were also negative by MID; 95 (94,05%) were negative by SN and 6 (5,94%) gave no result.

Considering the SN results as standard, the IEOP has shown to be a useful technique for screening particularly for laboratories where cell culture facilities are not available. The positive sera have, however, to be retested either by SN or ELISA, in order to be sure of its positivity, since about 10% of samples were false positives. The MID, despite simpler than IEOP, showed 15,79% false negatives, what might compromise its use as a preliminary test for massive serology.

INDEX TERMS: Immunoelectromorphoresis, serum neutralization, microimmunodiffusion, comparative tests, Aujeszky's disease.

SINOPSE.- Com o objetivo de determinar o teste de triagem mais eficaz para a identificação de anticorpos contra o vírus da Doença de Aujeszky em larga escala, imunoelctrosmoforesse (IEOF), soroneutralização em microtécnica (SN) e imunodifusão em gel de agar foram adaptados às nossas condições de trabalho e comparados. Para a comparação entre IEOF e SN, 575 soros de campo de suínos dos Estados de Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul foram utilizados. A IEOF detectou 358 (100%) soros positivos, enquanto a SN detectou 293 (81,84%) positivos e 35 (9,78%) negativos. Em 30 (8,38%) amostras, nenhum resultado pôde ser obtido com a SN devido a contaminação ou toxicidade aos cultivos celulares. Em 217 (100%) amostras negativas por IEOF, 199 (91,7%) foram negativas por SN. As 18 (8,29%) restantes não permitiram resultado por SN.

MID foi incluída na comparação através da testagem compa-

rativa de 386 soros pelos três métodos. De 285 (100%) soros IEOF positivos, a SN detectou 226 (79,3%) positivos, 31 (10,9%) negativos e em 28 (9,8%) não foi obtido resultado. A MID detectou 193 (67,7%) positivos, 84 (29,5%) negativos e 8 (2,8%) soros não permitiram um resultado conclusivo. Em 101 (100%) soros IEOF negativos, todos foram também negativos por MID; 95 (94,05%) foram negativos por SN e 6 (5,94%) não permitiram resultado.

Considerando os resultados da SN como padrão, a IEOF mostrou ser uma técnica útil para triagem, particularmente em laboratórios onde não são trabalhadas técnicas de cultivo celular. Os soros positivos necessitam, no entanto, ser retestados por SN ou ELISA, a fim de serem confirmados resultados positivos, uma vez que em torno de 10% das amostras foram falsos positivos. A MID, apesar de se constituir em uma técnica mais simples que a IEOF, mostrou 15,79% de falsos negativos, o que pode comprometer seu uso como um teste preliminar para sorologia em larga escala.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Imunoelctrosmoforesse, soroneutralização, microimunodifusão, testes comparativos, doença de Aujeszky.

¹ Aceito para publicação em 29 de janeiro de 1987.

² Equipe de Virologia e Imunologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Caixa Postal 2076, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90000.

INTRODUÇÃO

A Doença de Aujeszky (DA) ou Pseudo-raiva é uma enfermidade provocada por um vírus do grupo herpes, Alpha herpesvirus porcino I. Ela se manifesta em diferentes espécies animais, notadamente em suínos, bovinos, ovinos, caprinos e felinos, embora seja considerada primariamente uma doença de suínos (Gustafson 1981). Economicamente é nessa espécie que a DA se reveste de maior importância. Perdas animais atribuídas à PR registram cifras superiores a 100 milhões de dólares (Gustafson 1981).

No Brasil, a DA foi primeiramente diagnosticada em 1912 (Carini & Maciel 1912) sendo que desde então surtos têm sido verificados esporadicamente em diversos Estados (Braga & Faria 1934, Carneiro 1950, Bauer 1955, Silva & Döbereiner 1960, Hipólito et al. 1960/61).

Em 1983 ocorreram surtos de maior gravidade da enfermidade no Estado de Santa Catarina (Romero et al. 1984), São Paulo (Lowenthal & Bordin 1981) e Minas Gerais (Santos et al. 1985), causando vultosas perdas, estimadas por Santos et al. (1985) e Protas et al. (1986).

Métodos de diagnóstico sorológico de um grande número de amostras são a base para o estabelecimento da estratégia a ser adotada. Também é importante a identificação de animais positivos sorologicamente devido ao fato de que o vírus da DA pode manter-se em latência no animal infectado, podendo vir a eliminar o agente em ocasião de "stress", tornando-se fonte de contágio e perpetuação da enfermidade nos rebanhos (Gustafson 1981).

Dentre as técnicas disponíveis para o diagnóstico sorológico da DA, aquelas que têm recebido maior atenção no Brasil são a soroneutralização em microtécnica (SN), a microimunodifusão (MID) e o teste de absorção imunoenzimática (ELISA), sendo que este último ainda em caráter experimental (IPVDF, dados não publicados).

Em nosso laboratório foi adaptada a metodologia do diagnóstico sorológico da DA pelo método de Imunoelctrosmofores (IEOF) com base no descrito por Papp-Vid & Dulac (1979). Com o objetivo de utilizar a infraestrutura montada para o diagnóstico de triagem para Peste Suína Africana no País, procurou-se adequar a técnica às nossas condições de trabalho, permitindo assim que os vários laboratórios já equipados para executar a IEOF pudessem paralelamente realizar o "screening" para a DA.

O presente trabalho visou determinar a sensibilidade e especificidade da IEOF frente às duas outras técnicas mais utilizadas no País (SN e MID).

MATERIAL E MÉTODOS

Células

Células RK-13 foram cultivadas em meios EAGLE-MEM suplementado com 10% de soro de cabra e mantidas em passagens semanais na razão de 1:3.

Soros

Foram coletados 575 soros, provenientes de suínos dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e utilizados nas provas de IEOF e SN. Na comparação entre IEOF, SN e MID, foram testados 386 soros. Na comparação entre as formulações utilizadas na prova de MID foram testados 23 soros positivos e um soro negativo pelas provas de IEOF e SN.

Imunoelctrosmofores

Antígeno. Células RK-13 foram infectadas com a amostra do vírus NP (Bauer 1955) com uma multiplicidade de infecção 0,03. Após 48 horas os cultivos foram coletados apresentando aproximadamente 95% do efeito ci-

topático (ECP). Após três ciclos de congelamento e descongelamento, a suspensão foi centrifugada a 1.000 x G por 30 minutos. O sobrenadante foi tratado com solução saturada de Sulfato de amônia segundo Gutekunst et al. (1977). Após precipitação por uma noite, a suspensão foi centrifugada e o pellet ressuscitado em 1:10 do volume inicial. Após exaustiva diálise frente a solução salina tamponada (pH 7,4), o antígeno foi desidratado em polietilenoglicol (PEG PM 20.000) ou sacarose até 1/200 do volume inicial.

Testes de IEOF. Os testes foram realizados seguindo basicamente a técnica descrita por Pan et al. (1972). Resumidamente, Agarose 0,6% em tampão Barbital e colocada sobre as placas-suporte para 6 lâminas 25 x 75 mm (Gezmann Inst. Co., USA). Após, foram feitos orifícios de 3 mm de diâmetro, distando 12 mm entre si. A eletroforese foi realizada a 40 mA por placa durante 30 minutos. Em cada corrida foram incluídos controles positivos e negativos. A presença de linhas de precipitação entre antígeno e soro foi considerada como resultado positivo.

Soroneutralização em microtécnica

Para os testes de SN (Banks & Cartwright 1983) foram utilizadas placas de microtécnica com 96 orifícios. Os soros foram diluídos 1/2 e 1/4 em EAGLE-MEM, com dois orifícios por diluição, num volume de 25 µl. Após, 25 µl de uma diluição de vírus (cepa NP) contendo aproximadamente 100 DICT₅₀ foram colocados sobre as diluições de soro e incubados a 37°C por 60 minutos. Cincoenta microlitros de células RK-13 a uma concentração de 600.000 células/ml foram colocadas em cada orifício. Controles positivo e negativo bem como "back titrations" do vírus foram incluídos em cada bateria. As placas foram antes incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂.

A leitura das placas foi feita diariamente, sendo o resultado final lido após 5 dias. A inibição do ECP ao final desse período foi considerada como resultado positivo.

Microimunodifusão

Devido a dados de literatura conflitantes quanto à metodologia da técnica de MID, diferentes formulações foram testadas:

- Gel com tampão Barbital: foi preparado de acordo com Pfeiffer & Schipper (1979), com concentração de NaCl: 0, 0,75M, 1,5M e 3M.
- Gel com tampão fosfato: preparado segundo Carnero (1982) com variação na concentração de NaCl de 0, 0,75M, 1,5M e 3M.
- Gel com tampão Tris: preparado como descrito por Gutekunst et al. (1977), com variações nas concentrações de NaCl como nos anteriores.

As provas de MID foram realizadas em placas de Petri plásticas com 10 cm de diâmetro, segundo Gutekunst et al. (1977).

Os critérios utilizados para a avaliação das diferentes preparações foram a presença e nitidez das linhas de precipitação.

Para os testes comparativos entre IEOF, SN e MID foi utilizada a formulação com tampão fosfato sem NaCl, em função dos resultados obtidos.

RESULTADOS

Os resultados dos testes comparativos entre IEOF e SN estão representados no Quadro 1. Dos 575 soros testados, 358 (100%) foram positivos por IEOF. Na SN, 293 (81,84%) foram positivos, 35 (9,78%) negativos e 30 (8,38%) foram tóxicos aos cultivos celulares ou encontravam-se contaminados, impossibilitando a leitura de resultados.

Quadro 1. Comparação e avaliação dos testes de Imunoelctrosmofores (IEOF) e Soroneutralização em Microtécnica (SN) para a detecção de anticorpos contra o vírus da Doença de Aujeszky (575 soros)

	IEOF		SN			
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Tóxicos	Contam.
Nº de soros	358	- ^a	293	35	19	11
%	100		81,84	9,78	5,31	3,07
Nº de soros	-	217	-	199	4	14
%		100		91,7	1,84	6,45

^a - Sem reagentes.

Quadro 2. Comparação entre diferentes métodos de Microimunização (MID), de acordo com os critérios de presença de nitidez de linhas de precipitação (24 soros)

	Concentração de NaCl (M)			
	0	0,75M	1,5	3
Tampão Fosfato	++++	+++	++	+
Tampão Tris	+++	+++	++	+
Tampão Barbitol	±	±	±	±

Quadro 3. Comparação entre os testes de Imunoelctroforese (IEOF), Soroneutralização (SN) e Microimunodifusão (MID) na detecção de anticorpos contra o vírus da Doença de Aujeszky (DA) (386 soros)

	IEOF		MID			SN		
	Pos	Neg	Pos	Neg	S/r ^a	Pos	Neg	S/r
Nº de soros	285	—	193	84	8	226	31	28
%	100		67,7	29,5	2,8	79,3	10,9	9,8
Nº de soros	—	101	—	101	—	—	95	6
%		100		100			94,05	5,9

^a S/r Sem resposta.

^b — Nenhum soro reagente.

Quadro 4. Discrepâncias observadas entre Imunoelctroforese (IEOF), Soroneutralização (SN) e Microimunodifusão (MID) (386 soros)

	Resultados discrepantes observados					
	+IEOF -SN	+IEOF -MID	-IEOF +SN	+IEOF +SN -MID	+IEOF -SN +MID	-IEOF -SN +MID
% de soros ^a	10,87	29,47	—	15,79	1,75	—

^a Percentagem de soros com resultados discrepantes.

Dos 217 (100%) soros negativos por IEOF, 199 (91,7%) foram igualmente negativos por SN, sendo que os demais 18 (8,29%) não permitiram a obtenção de resultado.

O Quadro 2 mostra os resultados obtidos com diferentes formulações na execução da MID. Os critérios utilizados apontaram a preparação com tampão fosfato sem NaCl como a mais adequada, motivo pelo qual a mesma foi utilizada nos testes comparativos com as demais técnicas.

A comparação entre IEOF, SN e MID está representada no Quadro 3. Em 386 soros testados, 285 (73,83%) foram positivos pela IEOF. Dentre estes, 193 (50%) foram positivos por MID e 226 (58,54%) por SN. Oitenta e quatro (21,76%) soros positivos por IEOF foram negativos por MID.

Na SN, 31 (10,87%) dos soros IEOF positivos resultaram negativos, enquanto 28 (9,8%) não permitiram resultado por se encontrarem tóxicos aos cultivos celulares ou contaminados.

A IEOF identificou 101 (26,16%) soros negativos, que foram confirmados por MID. A SN confirmou o resultado negativo em 95 (24,61%) desses soros, sendo que os 6 restantes não permitiram a obtenção de resultado com esta técnica.

Considerando os 285 soros positivos em pelo menos um dos três testes, foi possível determinar a percentagem de discrepâncias observadas entre os resultados obtidos (Quadro 4). Em relação à SN, a IEOF revelou um índice de 10,87% de falsos positivos e nenhum falso negativo. A MID apresentou um índice de 1,75% de falsos positivos e 15,79% de falsos negativos.

DISCUSSÃO

No estabelecimento de uma nova metodologia diagnóstica, vários parâmetros devem ser considerados, tais como sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e custos de implantação e execução da técnica. Outro aspecto fundamental a ser analisado é a sua aplicabilidade a estudos massivos, isto é, envolvendo grande número de amostras, a fim de permitir seu uso em larga escala.

A técnica padrão para o diagnóstico sorológico da DA tem sido a SN (Hill et al. 1977, Banks & Cartwright 1983) e, mais recentemente, a técnica de ELISA (Todd et al. 1981, Banks & Cartwright 1983).

No entanto, a aplicação prática em particular da técnica de ELISA traz problemas que se tornam difíceis de resolver com rapidez, em um país de dimensões continentais como o Brasil. Haveria a necessidade de equipagem de vários laboratórios para desenvolver a técnica, com sub-utilização do equipamento destinado a execução do IEOF. Consequentemente, os investimentos iniciais seriam bastante vultosos devido ao custo do equipamento, além do treinamento de pessoal necessário.

A técnica de IEOF apresentou resultados satisfatórios, se considerado como um método de "screening" de grande número de soros. A velocidade de processamento das amostras situou-se em torno de 90-120 minutos até a obtenção do resultado final, o que é inatingível com as demais. O custo de implantação da mesma seria praticamente nulo se utilizados os laboratórios já preparados para a execução da triagem sorológica para Peste Suína Africana. Além disso, a análise da sensibilidade da prova revelou que não foram encontrados falsos negativos, o que pesa em favor de sua utilização como teste preliminar. A sua especificidade fica comprometida com uma percentagem de aproximadamente 10% de falsos positivos em relação à SN (Quadros 1 e 3). Não obstante, permite a obtenção de resultados em soros que devido à toxicidade aos cultivos celulares ou à contaminação, seriam impraticáveis na SN.

Outros autores compararam a IEOF com a SN e/ou MID. Banks & Cartwright (1983) detectaram 95,31% de positivos com a IEOF, se considerada a SN como 100%, em 521 soros de campo. Esses autores detectaram ainda 91,4% de positivos com o MID. Papp-Vid & Dulac (1979) identificaram 100% de positivos tanto com IEOF como com SN. No entanto, foram examinados somente 50 soros. Tais diferenças possivelmente sejam devidas a diferenças nas metodologias empregadas no processamento das três técnicas.

O teste de MID, embora as diferentes variações testadas (Quadro 2) apresentou um índice de sensibilidade menor que o da SN. Estes falsos negativos obtidos comprometem seu uso como instrumento de triagem, pois uma percentagem de animais positivos (em nosso estudo 15,79%) não serão identificados. Não obstante, a MID foi usada para a detecção de plantéis infectados no Estado de Santa Catarina, com resultados satisfatórios (Romero 1984), desde que sejam conhecidas sua sensibilidade e especificidade (Thawley et al. 1982).

Nossos resultados permitem afirmar que o IEOF pode vir a ser uma técnica útil para levantamentos de triagem na sorologia da DA. O processamento de um grande número de soros poderia ser realizado nos laboratórios regionais já equipados para a execução da IEOF, sendo que os positivos seriam remetidos a centros de referência ou laboratórios capacitados para a execução da prova de SN ou ELISA. Isto acarretaria em um número menor de amostras sendo remetidas aos laboratórios de referência, sem os inconvenientes de serem obtidos falsos negativos nos testes

realizados nos laboratórios regionais e com um melhor aproveitamento da infra-estrutura laboratorial já disponível no País.

REFERÊNCIAS

- 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.
- Bauer A.G. 1955. Primeira constatação do Mal de Aujeszky no Rio Grande do Sul. *Arq. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre*, 1:15-16.
- Braga A. & Faria A. 1934. Paralysis Bulbar Infectuosa (Pseudorabia, Peste de coçar, doença de Aujeszky). *Bolm Inst. Vital Brazil, Rio de J.*, 16:3-23.
- Carini A. & Maciel J. 1912. La pseudoragie ou paralysie bulbaire infectieuse au Brésil. *Bull. Soc. Pathol. Exotique* 5:576-578.
- Carneiro V. 1950. Distribuição geográfica e frequência da doença de Aujeszky no Brasil. *Biológico, S. Paulo*, 16(3):49-58.
- Carnero R. 1982. Peste porcina africana: conocimiento de la enfermedad. *Publ. Cient. nº 3, IICA Serie Salud Animal, San Jose, Costa Rica*. 244 p.
- Gustafson D.P. 1981. Herpesvirus diseases of mammals and birds: Comparative diagnosis, p. 205-265. In Kustak E. & Kurstak C. (eds) *Comparative Diagnosis of Viral Diseases, Vol. 3. Academic Press, London*.
- Gutekunst D.E., Pirtle E.C. & Mengeling W.L. 1977. 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., Mc Adaragh J.P., Scawright G.L., Solorzano R.F. & Stewart W.C. 1977. Recommended minimum standard for diagnostic tests employed in the diagnosis of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Proc. 20th An. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians*, p. 375-390.
- Hipólito O., Silva J.M.L., Batista Jr. J.A. & Lima S.N. 1960/61. A doença de Aujeszky em suínos no Estado de Minas Gerais. *Arqs Esc. Sup. Vet., Belo Horizonte*, 13:61-67.
- Lowenthal C.F.W. & Bordin E.L. 1981. Aujeszky, um caso de campo. *Brasil Suinícola* 4:34-35.
- Pan I.C., De Boer C.J. & Hess W.R. 1972. African Swine Fever: application of immunoelectrophoresis for the detection of antibody. *Can. J. Comp. Med.* 36:309-316.
- Papp-Vid G. & Dulac G.C. 1979. Pseudorabies. Adaptation of the countercurrent immunoelectrophoresis for detection of antibodies in porcine serum. *Can. J. Comp. Med.* 43:119-124.
- Pfeiffer N.E. & Schipper I.A. 1979. Evaluation of Pseudorabies viral antigens in the agar gel immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.* 40(4):595-598.
- Protas J.F.S., Sobestiansky J. & Soncini R.A. 1986. Custo de um surto da doença de Aujeszky. *Pesq. Agropec. Bras.* 21(7):757-761.
- Romero C.H., Rowe C.A., Provenzano G.L., 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.
- Santos J.L., Ferreira L.F.A., Ribeiro M.F.B. & Faria J.E. 1985. Observações zootécnicas, sanitárias e econômicas de um surto da doença de Aujeszky em suínos em Minas Gerais, p. 130. In: *An. Congr. Bras. Vet. Espec. Suínos, Rio de Janeiro*.
- Silva R.A. & Döbereiner J. 1960. Nota sobre a doença de Aujeszky no município de Sapucaia, Estado do Rio de Janeiro. *Arqs Inst. Biol. Anim., Rio de J.*, 3:83-90.
- Tawley D.G., Johnson M.E., Solorzano R.F. & Wright J.C. 1982. Pseudorabies virus microimmunodiffusion test: validity determinations. *Proc. 25th An. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians*, p. 167-172.
- Tood D., Mc Nair J., McNulty M.S. & Mc Ferran J.B. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Aujeszky's disease virus in pigs. *Vet. Rec.* 109(24):534-537.

PARALYSIS IN *Gallus gallus* AND *Cairina moschata* INDUCED BY LARVAE OF *Argas* (*Persicargas*) *miniatus*

FERNANDO E. P. DE MAGALHÃES², CARLOS L. MASSARD³ e NICOLAU M. DA SERRA FREIRE^{2,3}

SINOPSE.- Magalhães F.E.P., Massard C.L. & Serra Freire N.M. 1987. [Paralisia em *Gallus gallus* e *Cairina moschata* induzida por larvas de *Argas* (*Persicargas*) *miniatus*.] Paralysis in *Gallus gallus* and *Cairina moschata* induced by larvae of *Argas* (*Persicargas*) *miniatus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(2):47-49. Depto Biologia Animal, Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, RJ 23851, Brazil.

A ação tóxica da larva de *Argas* (*P.*) *miniatus* procedente do Estado do Rio de Janeiro foi estudada em condições de laboratório com temperatura e umidade controlada, utilizando-se pintos (*G. gallus* e patos (*C. moschata*) como hospedeiros. Lesões cutâneas do tipo ulcerativo foram evidenciadas após fixação das larvas, sendo o grau de patogenicidade mais acentuado quanto maior fosse o estado de ingurgitamento larvar. Sintomas clínicos caracterizados como paralisia, causada pela ação tóxica das larvas do carrapato foram observados em 20 pintos e quatro patos infestados com larvas, 3 a 5 dias após fixação das larvas. Incoordenação motora, aumento da sensibilidade, paralisia das patas e asas e flexão da cabeça para baixo foram os sintomas mais freqüentes, finalizando com morte por parada respiratória. À necropsia as lesões macroscópicas mais evidentes foram: atrofia esplênica, modificação da coloração e friabilidade do fígado e estase biliar. Exames histopatológicos revelaram lesões em órgãos como: pele, pulmão, coração, baço, fígado, rins e glândulas ad-renais. Esta foi a primeira citação de *A.P. miniatus* como agente indutor de paralisia.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Paralisia por carrapato, toxicose, *Argas miniatus*.

ABSTRACT.- A study was made of the toxic action of *Argas* (*P.*) *miniatus* Koch, 1844, using material collected in the state of Rio de Janeiro, Brazil. This study was conducted in the laboratory under controlled temperature and humidity conditions, using chickens (*Gallus gallus*) and ducklings (*Cairina moschata*) as hosts. Cutaneous ulcerative lesions were observed after larval attachment. The degree of pathogenicity increased with increasing engorgement of the larvae. Clinical symptoms characterized as tick paralysis were observed in 20 chicks and four ducklings after 3 to 5 days of larval infestation. The most frequent symptoms were: motor incoordination, increased sensibility, paralysis of the feet and wings and ventral flexion of the head. Death resulted from respiratory failure. Post-mortem, the most obvious macroscopic lesions were: atrophy of the spleen, biliary stasis and yellowing of the liver. Histopathological studies showed lesions of the skin, lungs, heart, spleen, kidneys, adrenal glands and liver. This is the first reference to the toxic effect or tick paralysis due to the larvae of *A. (P.) miniatus*.

INDEX TERMS: Tick paralysis, toxicosis, *Argas miniatus*.

INTRODUCTION

Argas (*Persicargas*) *miniatus* Koch, 1844 is one of the most common ectoparasites of domestic birds in Brazil. The importance of this species relates not only to the general debilitating effects of parasitism but relates also to the transmission of pathogenic agents and to its toxic reaction on the host. *A. miniatus* was first described by Koch (1844), in examination of samples derived from Demerara in British Guiana. The host species, however, was not identified nor was any mention made about its toxicity or of the number of specimens examined. Rohr (1909) reported work with *Argas* (*Persicargas*) *persicus* (Oken, 1818) in Brazil without considering the morphological differences with *A. miniatus* and did not make reference to the toxicity of this species for birds.

Neitz (1962), in South Africa, reported that tick paralysis is an acute or subacute disease of certain mammals and birds and is caused by a neurotoxin found in at least 20 members of the family Ixodidae, and four species of the family Argasidae. The disease is characterized by flacid paralysis which progresses rapidly from the body extremities to the central nervous system, causing incoordination and sensorial changes. Death frequently results from respiratory paralysis. Only *A. persicus* was incriminated as causing this disease in birds.

For a considerable time there has been controversy in respect of the differential identification of *A. miniatus* and *A. persicus*, which are common avian parasites in Europe, Asia and Africa. Kohls et al. (1970) in the investigation of species of the subgenera *Persicargas* in the Americas, showed that *A. miniatus*

¹ Accepted for publication on March 5, 1987.

Part of the M.Sc. Thesis presented by the first author at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), under the auspices of CNPq and Embrapa.

² Laboratório Nacional de Referência Animal - Lanara, Cx. Postal 50, Pedro Leopoldo, Minas Gerais 33600, Brazil.

³ Departamento de Biologia Animal, UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851, Brazil.

is indeed a separate species from *A. persicus*. The species *A. persicus* appears to be rare in the new world countries although it has been found in Maryland, Pennsylvania, Georgia, California and Paraguay (Kohls et al. 1970). *A. miniatus* is now reported from Panama (Dunn 1923, Kohls et al. 1970), Venezuela (Vogelsang & Dias 1960, Jones et al. 1972), Brazil (Aragão & Fonseca 1961, Kohls et al. 1970), British Guyana, Colombia and Trinidad (Kohls et al. 1920) and Cuba (Cruz 1974). However, Rosenstein (1976), in Pennsylvania, examined 20 week-old Leghorn pullets, heavily infested with *A. persicus* larvae. It was noted that the birds were severely depressed and recumbent. The signs were quickly reversed when the tick larvae were removed. Findings were negative following detailed diagnostic procedures and this, together with the rapid recovery of disinfested animals, is suggested as indicative that the tick larvae caused the paralysis.

The present work has been undertaken to investigate the specific toxic activity of *A. miniatus* in its larval stage, in infestations of poultry in Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Day-old Leghorn chicks were kindly supplied by the Ornithological Section of the Animal Health Research Unit (UAPNPSA) of EMBRAPA, Itaguaí/RJ, and ducklings one week old were supplied by the UFRRJ, Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz. Ticks identified as *A. miniatus* were obtained from naturally occurring infestations of poultry in the state of Rio de Janeiro. Larvae from these chicks were obtained under controlled laboratory conditions (28-30°C and 70-80% relative humidity) and were used for the experimental infestation of the two host species. Experiments were made to confirm that paralysis can be induced in chickens and ducklings following artificial infestation with larvae of *A. miniatus*.

Twenty chicks and four ducklings were each infested with 100 to 200 larvae. The larvae were placed directly on the skin of the birds and the latter were then enclosed in small cloth bags leaving only the head protruding. The infestations were made at night over a period of twelve hours during which time the birds remained enclosed in their bags to facilitate the contact between host and parasite. The bags were then removed and the birds were observed daily. An additional 20 chicks and 4 ducklings, which had not been infested were maintained under similar conditions. The degree of engorgement, the natural fall-off of the larvae, the cutaneous lesions and the symptoms of the hosts were recorded.

Blood was collected from birds which showed signs of paralysis for intraperitoneal inoculation of sensitive birds of the same species. All the larvae were removed on the 5th day from 2 chickens which had developed paralysis and did not die. These birds were observed daily thereafter for 15 days.

Post-mortem examinations were made on 9 of the birds (7 chicks and 2 ducklings) which had shown signs of paralysis and died, and in the 2 chicks which were killed 15 days after removal of the larvae before engorgement. Internal organs were examined macroscopically and fragments were immersed in 10% formalin for fixation for subsequent histopathological examinations. The preparation and examination of specimens submitted for histopathology was very kindly undertaken by the Department of Veterinary Surgery of the Federal University of Minas Gerais.

RESULTS

Without exception, all the birds (20 chicks and 4 ducklings) subjected to infestation of tick larvae developed symptoms of disease, characterized principally as a progressive paralysis, on the 2nd and 3rd day after infestation. In one group of 10 chickens and 1 duckling the numbers of larvae used for individual infestation (number applied) and the numbers of larvae, which reached the engorged state (number collected), are recorded in Table 1. In all cases, the first signs of disease which were observed was the onset of motor incoordination. This was

Table 1. *Experimental larval infestation of 10 chickens (Gallus gallus) and one duckling (Cairina moschata) with A. (P.) miniatus*

Host ^a	Number of larvae	
	Applied	Collected up to death of host
D 01	160	28
C 01	104	39
C 02	109	26 ^b
C 03	129	31
C 04	153	31 ^b
C 05	130	27
C 06	194	12
C 07	200	57
C 08	100	16
C 09	100	18
C 10	100	20

^a D = duckling, C = chicken.

^b Larvae were removed on 5th day, before complete engorgement.

followed by dysphagia, hypersensitivity and paralysis of the wings and legs. As the latter condition developed, the birds assumed first a sitting position and later presented a picture of apathy with the head and neck flexed in a drooping position. Finally, the birds reached a state of torpor shortly before death. The disease had a course of 7 days.

During their infestation on the host, the larvae caused cutaneous ulcerative lesions which increased in size and severity during the growth period of the larvae. However, a continuous regression of the lesions commenced after the engorged larvae naturally detached from the host, or after partially engorged larvae were experimentally removed, leaving only a minimal scar to mark their presence.

No evidence of disease was observed after the intraperitoneal injection of blood from diseased birds into sensitive animals of the same species.

In the case of 2 chickens, which had shown typical progressive signs of tick paralysis arising from partially engorged larvae, a return to normal health was made after the larvae had been removed. At post-mortem examination the most evident macroscopic lesions were: splenic atrophy, yellowish discoloration of the liver, biliary stasis and an increase of fluid in the anterior portion of the alimentary tract. Histopathological examinations showed the presence of lesions in the skin, cerebrum and cerebellum, lungs, heart, spleen, kidneys, adrenal gland and liver. In comparison with tissues from normal chickens of a similar age, the skin lesions were hypertrophy and erosion of the epidermis in the region of fixation to the host and, in some cases, ulceration of the tissue; oedema and haemorrhages were observed in the tissues adjacent to the subcutaneous lesions. Proliferation of mononuclear cells and formation of fibrous tissue was observed only in 1 case. Cerebrum and cerebellum: areas of focal cellular proliferation and discrete oedema were observed in one sample of cerebral cortex. Lungs: reduction of the lumen of bronchii, congestion and discrete haemorrhagic foci of the alveolae. Heart: cardiac fibres with nuclear hypertrophy and peripheral condensation of chromatin, necrotic areas with dissociation of cardiac fibres and coagulation, cloudy swelling and interstitial oedema. Spleen: follicular hypertrophy with absence of germinative centres. Kidneys: cloudy swelling of tubular epithelium and deposits of proteic material in the lumen. Adrenal gland: cortical hypertrophy. Liver: hypertrophy of the liver cells, formation of fat globules and cloudy swelling;

necrotic foci with cellular dissociation and coagulation were observed in one sample.

In the 2 chicks, which after removal of the larvae returned to normal health, no lesions were found.

DISCUSSION

The present study of tick paralysis caused by the toxic action of tick larvae in infestation of chickens and ducklings illustrates two original aspects: 1) this report appears to be the first recorded description of the disease in birds born and reared in Brazil; and 2) the causative agent of the disease has been identified as *Argas (Persicargas) miniatus*, although *A. persicus* has been identified with tick paralysis on several previous occasions in various countries. A review of the literature was presented by Neitz (1962) and Rosenstein (1976).

In a more recent review Gothe et al. (1979) showed that the capacity for ticks to produce paralysis has been demonstrated, described or suspected in a total of 43 different species in 10 genera. In the genera *Argas* the species reported were: *A. arboreus* Kaiser, Hoogstraal and Kohls; *A. persicus* (Oken); *A. radiatus* Railliet; *A. reflexus* (Fabricius); *A. sanchezi* Dugés, and *A. walkerae* Kaiser and Hoogstraal.

In this study symptomatic picture of tick paralysis caused by *A. miniatus* larvae, form the first manifestations of muscular incoordination to the final lethal effect, is very similar to that described by Neitz (1962), by Emmel (1945) and by Gothe (1971) in their reports of *A. persicus* infestations.

The high mortality caused by the toxicosis of *A. miniatus* and the rapid recovery of the hosts when the ticks are removed before becoming completely engorged is similar to tick paralysis provoked in birds by other species of ticks. Rosenstein (1976) and Gothe (1971) were unanimous in affirming that the removal of the larvae before complete engorgement favoured recuperation of the host and agreed with respect to the relationship of the number of parasites and the severity of the symptoms. Individual birds infested with 100 to 200 larvae showed almost the same picture. The small differences that were observed are not regarded as significant in the clinical or pathological aspect, except that with the greater number of larvae the number of cutaneous lesions were also proportionately greater.

The general opinion is that there is a strong relation between the state of engorgement of the larvae, the degree of toxicosis and the regression of cutaneous lesions after removal of the parasites. This same relationship was observed in this study.

In all cases, chickens and ducklings alike, in which the disease progresses, death is caused by respiratory failure. This observation confirms the findings of Gothe et al. (1971) and of Kunze & Gothe (1971), who using clinical studies supported with electrocardiographic and electromyographic investigations, demonstrated that the respiratory muscles are primarily affected while the heart functions are only influenced indirectly at a later stage. Also Rosenstein (1975) showed that birds which died from tick paralysis caused by *A. persicus* were negative in tests using

material collected from hosts for research of possible virus or bacterial infections. Resulting from these observations it can be affirmed that respiratory failure is the immediate cause of death, even though lesions are present in the principal organs.

Acknowledgements. - The authors wish to record their gratitude to the late Professor W. O. NEITZ for his help in the orientation of this research and his collaboration regarding the basic scientific literature. They are also grateful to Dr. Jack Rodican for his stimulus and collaboration in the preparation of this paper.

REFERENCES

- Aragão H. & Fonseca F. 1961. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes de Fauna Ixodológica Brasileira. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 59(2): 155-179.
- Cruz J. 1974. Notas adicionales a la fauna de garrapatas (Ixodoidea) de Cuba. I. Argasidae de las aves. Poeyana (La Habana) nº 129, p. 1-3.
- Dunn L.H. 1923. The ticks of Panama, their hosts, and the diseases they transmit. Am. J. Trop. Med. and Hygiene 3, p. 91-92.
- Emmel M.W. 1945. So-called tick paralysis in chickens. J. Am. Vet. Med. Ass. 106: 108.
- Gothé R. 1971. Die durch *Argas (Persicargas) persicus* Larven bedingte Paralyse der Hühner. I. Ueber den Einfluss des Saugzustandes und der Infestationsrate auf die klinische Manifestation. Z. Parasitenk. 35: 298-307.
- Gothé R., Kunze K. & Mechow O. 1971. Untersuchungen ueber die Todesursache bei der durch *Argas (Persicargas) persicus* Larven bedingten Zeckenparalyse der Hühner. Tropenmed. u. Parasitol. 22(4): 430-435.
- Gothé R., Kunze K. & Hoogstraal H. 1979. The mechanisms of pathogenicity in the tick paralysis. J. Med. Entomol. 16(5): 357-369.
- Jones E.K., Clifford C.M., Keirans J.E. & Kohls G.M. 1972. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western Hemisphere. Brigham Young Univ. Sci. Bull. Biol. Ser. 17(4): 1-40.
- Koch C.L. 1844. Systematische Uebersicht ueber die Ordnung der Zecken. Arch. Naturgesch. 10(1): 217-239.
- Kohls G.M., Hoogstraal H., Clifford C.M. & Kaiser M.N. 1970. The subgenus *Persicargas* (Ixodoidea, Argasidae) Argas. 9. Redescription and new world records of *Argas (P.) persicus* (Oken), and resurrection, redescription and records of *A. (P.) radiatus* (Railliet), *A. (P.) sanchezi* (Dugés) and *A. (P.) miniatus* (Koch), new world ticks misidentified as *A. (P.) persicus*. Ann. Entomol. Soc. Am. 63(2):590-606.
- Kunze K. & Gothe R. 1971. Die durch *Argas (Persicargas) persicus* Larven bedingte Paralyse der Hühner. III. neurophysiologische Untersuchungen. Z. Parasitenk. 36:251-264.
- Neitz W.O. 1962. The different forms of tick toxicosis: a review. 2nd Meeting of the FAO/OIE Expert Panel on Tick-born Diseases of Livestock, Cairo, 3-10 December, p. 20.
- Rohr C.J. 1909. Estudos sobre Ixodidas do Brasil. Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz, Ed. Gomes, Irmão & Cia, Rio de Janeiro, 226 p.
- Rosenstein M. 1976. Paralysis in chickens caused by larvae of the poultry tick, *Argas persicus*. Avian Diseases 20(2): 407-409.
- Vogelsang E.G. & Dias J.A.T.S. 1960. Nova contribuição para o estudo da fauna ixodológica da Venezuela. Anais dos Serviços de Veterinária e Indústria Animal de 1953-1954 (Mozambique?), p. 21-25.

INTOXICAÇÃO POR *Senecio* spp. (Compositae) EM BOVINOS NO RIO GRANDE DO SUL¹

MARIA DEL CARMEN MÉNDEZ^{2,3}, FRANKLIN RIET-CORREA^{2,3} e ANA LUCIA SCHILD^{2,3}

ABSTRACT.- Méndez M.C., Riet-Correa F. & Schild A.L. 1987. [Poisoning by *Senecio* spp. (Compositae) in cattle in southern Brazil.] Intoxicação por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(2):51-56. Laboratório Regional de Diagnóstico, Fac. Vet., Univ. Fed. Pelotas, Campus Universitário, Pelotas, RS 96100, Brazil.

Ten outbreaks of poisoning by *Senecio* spp. which occurred in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, from 1978 to 1985, are described. Thirteen post-mortem examinations were performed and additionally 5 materials sent in were examined. The disease affected cows, steers, heifers and calves. Clinical signs characterized by diarrhea, rectal tenesmus, incoordination and aggressiveness, were observed 1 to 4 days before death. Other manifestations of the disease in some animals were progressive weight loss, dermatitis of the nose and subcutaneous edemas. Gross and microscopic pathology were characteristic of the intoxication by pyrrolizidine alkaloids. The gallbladder showed, in few cases, nodules measuring 2 to 3 mm distributed in the whole mucosa. The central nervous system showed spongy degeneration of the white matter, in the border between this and the grey matter and sometimes in the grey matter. In every farm in which the disease occurred variable amounts of *Senecio brasiliensis*, *S. selloi*, *S. heterotrichius*, *S. cisplatinus* and *S. leptolobus* were present. The first 4 species are experimentally toxic for cattle and chicks. Most outbreaks occurred between July and August. Considering that the intoxication is progressive and that the clinical signs appeared many months after the ingestion of the plant, it is possible that consumption occurs between May and August, period in which the plant is growing and the disponibility of pasture is considerably decreased. Sheep were not present in any farm in which the disease was diagnosed.

INDEX TERMS: Hepatotoxic poisonous plants, plant poisoning, *Senecio brasiliensis*, *Senecio heterotrichius*, *Senecio selloi*, *Senecio cisplatinus*, *Senecio leptolobus*, Compositae, cattle, pathology, pyrrolizidine alkaloids.

SINOPSE. - Descrevem-se 10 surtos de intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no Rio Grande do Sul, ocorridos no período 1978-1985, sendo realizadas 13 necropsias e adicionalmente processados 5 materiais enviados. A doença afetou vacas, novilhos, novilhas e terneiros. Os sinais clínicos eram observados 1 a 4 dias antes da morte, caracterizando-se por diarreia, tenesmo retal, incoordenação e agressividade. Também observou-se, em alguns animais, perda de peso progressiva; lesões de dermatite no focinho; ascite e edemas subcutâneos. As lesões macroscópicas e histológicas observadas eram características de intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos. A vesícula biliar apresentou, em 3 casos, nódulos de 2 a 3 mm, distribuídos em toda a mucosa. No sistema nervoso central observaram-se lesões de espongiose, na substância branca, no limite entre esta e a substância cinzenta, e, às vezes, na substância cinzenta. Em todos os estabelecimentos onde ocorreu a doença existiam quantidades variáveis de *Senecio brasiliensis*, *S. selloi*, *S. heterotrichius*, *S. cisplatinus* e *S. leptolobus*. As 4 primeiras espécies são tóxicas

experimentalmente para bovinos e frangos. A maioria dos surtos ocorreram entre julho e janeiro. Considerando que o efeito da intoxicação é progressivo, e que os sinais clínicos podem aparecer vários meses após a ingestão da planta, é provável que a ingestão ocorra entre os meses de maio e agosto, período em que a planta está em brotação e a disponibilidade de pastagem diminui consideravelmente. Em nenhum dos estabelecimentos afetados existiam ovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas hepatotóxicas, intoxicação por planta, *Senecio brasiliensis*, *Senecio heterotrichius*, *Senecio selloi*, *Senecio cisplatinus*, *Senecio leptolobus*, Compositae, bovinos, patologia, alcalóides pirrolizidínicos.

INTRODUÇÃO

A intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos é uma doença hepática caracterizada por cirrose, que tem sido descrita em vários países (Bull et al. 1968, Fowler 1968, Tilt 1969, Mortimer & White 1975, Walker & Kirkland 1981), incluindo Argentina (Okada & Carrillo 1975, Neffen & Pachoud 1979), Uruguai (Podestá et al. 1977) e Brasil (Carvalho & Maugé 1946, Curial & Guimarães 1958, Méndez et al. 1985).

Os alcalóides pirrolizidínicos estão presentes em vários gêneros de plantas das famílias Compositae, Leguminosae e Boragi-

¹ Aceito para publicação em 9 de março de 1987.

Trabalho financiado pela Embrapa-UEPAE Pelotas.

² Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) Campus Universitário, Pelotas, Rio Grande do Sul 96100.

naceae, particularmente nos gêneros *Senecio*, *Crotalaria*, *Heliotropium*, *Amsinckia*, *Echium* e *Trichodesma* (Bull et al. 1968).

A doença afeta a maioria dos animais domésticos, sendo os suínos a espécie mais suscetível, seguindo-se em ordem decrescente os frangos, bovinos, eqüinos, ratos e camundongos. Os ovinos e caprinos são os mais resistentes (Hooper 1978).

Em condições naturais, a doença ocorre principalmente em bovinos e eqüinos (Muth 1968) e é de evolução crônica (Bull 1955, Craig et al. 1978), sendo que as mortes geralmente acontecem vários meses após o animal ter cessado de ingerir a planta tóxica (Bull 1955, Bull 1961, Craig et al. 1978, Fowler 1968).

Os alcalóides pirrolizidínicos causam no fígado uma lesão progressiva caracterizada por necrose, edema, fibrose, proliferação de ductos biliares e megalocitose generalizada (Bull et al. 1968, Hooper 1978). Esta última alteração, aumento de tamanho das células, é característica e considerada patognomônica da doença em animais em pastejo (Bull et al. 1968).

No Brasil a ocorrência dessa intoxicação, associada à ingestão de *Senecio brasiliensis*, tem sido relatada em eqüinos no Estado de São Paulo (Carvalho & Maugé 1946). Nesse mesmo Estado, Nazário & Portugal (1972) suspeitaram dessa intoxicação em uma mortalidade de bovinos.

Estudos histopatológicos realizados em eqüinos, de procedências diversas no Estado do Paraná, concluíram que as lesões hepáticas observadas eram possivelmente uma intoxicação crônica provocada pela ingestão de plantas do gênero *Senecio* ou de plantas contendo alcalóides afins (Curial & Guimarães 1958).

Diversos surtos da doença em bovinos, no Rio Grande do Sul, causados provavelmente pela ingestão de *Senecio brasiliensis* são mencionados por Tokarnia & Döbereiner (1984), que realizaram estudos de reprodução experimental dessa intoxicação mediante a administração desta espécie.

No Brasil, segundo Motidome & Ferreira (1966), existem cerca de 128 espécies de *Senecio*, embora algumas delas sejam pouco encontradas. A distribuição geográfica dessas espécies é a região Centro-Sul do País, e a mais freqüente, nessa região, é *Senecio brasiliensis* Less., conhecido vulgarmente por várias deno-

minações: Tasneirinha, Catião, Flor das Almas, e, sobretudo, Maria Mole.

O objetivo do presente trabalho é descrever os surtos de intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos, diagnosticados pelo Laboratório Regional de Diagnóstico no período 1978-1985, assim como discutir os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da enfermidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados epidemiológicos dos surtos e as manifestações clínicas dos animais afetados foram observados nos estabelecimentos onde ocorreu a doença, ou obtidos através de históricos aportados pelos produtores.

Os estudos patológicos foram realizados através de necropsias e/ou materiais dos diversos órgãos enviados ao Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Faculdade de Veterinária da UFPel. Foram estudados 10 surtos da doença, sendo realizadas 13 necropsias e adicionalmente processados 5 materiais enviados ao LRD.

Os materiais para histologia foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados a 6 micra e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

O estudo histológico incluiu o sistema nervoso central de 10 animais, para o qual foram realizados cortes histológicos a nível de córtex cerebral, cápsula interna, tálamo, tubérculos quadrigêmeos anteriores, ponte, pedúnculos cerebelares, cerebelo e medula oblonga.

As plantas do gênero *Senecio*, coletadas nos diversos estabelecimentos, foram identificadas botanicamente na Universidade Federal de Pelotas ou no Museu Nacional do Rio de Janeiro.

RESULTADOS

Epidemiologia

O número de animais que morreram em cada estabelecimento, as categorias afetadas, assim como o ano e a época de ocorrência dessas mortes constam no Quadro 1.

Em todos os estabelecimentos existiam quantidades consideráveis de diversas espécies de *Senecio*. Nos estabelecimentos A, B, C e D, existia *Senecio brasiliensis* e *S. selloi*. No estabelecimento E, existiam 2 poteiros com grande quantidade de *S. heterotrichius*, que mostrava evidências de ter sido consumido, tam-

Quadro 1. Surtos de intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no Rio Grande do Sul

Estabelecimento	Município	Total de bovinos	Mortes Nº	%	Categorias afetadas	Época	Ano
A	Capão do Leão	18	1	5,5	Vacas	Agosto	1978
B	Capão do Leão	30	9	30,0	Vacas (8), Novilhas (1)	Agosto-dezembro	1979
C	Pelotas	40	3	7,5	Vacas (3)	Agosto-setembro	1979
D	Jaguarão	320	8	2,5	Vacas	Agosto-dezembro	1979
			14	4,3	Vacas		1980
			4	1,2	Vacas		1981
E	Capão do Leão	60	3	5,0	Vacas	Julho-setembro	1983
F	Capão do Leão	80	1	1,2	Novilhos,	Outubro-janeiro	1983
		74	7	9,4	Vacas		
G	Pedro Osório	93	5	5,3	Novilhas	Julho-fevereiro	1983
H	Barra do Ribeiro	320	20	6,2	Novilhos	Outubro-dezembro	1983
I	Capão do Leão	30	3	10,0	Terneiros (1), Vacas (2)	Setembro-dezembro	1984
J	Capão do Leão	400	10	2,5	Terneiros (3), Abril ^a Vacas (7)		1986

^a Neste estabelecimento (J), morreram 2 animais no mês de abril de 1986, sendo que vinham acontecendo mortes desde vários meses anteriores, sem que o proprietário determinasse o período com precisão.

bém *S. seloi* e, em menor freqüência, *S. brasiliensis* e *S. cisplatinus*; porém, em outro potreiro em que os animais tinham estado no mês de julho, existia muita quantidade de *S. brasiliensis*. No estabelecimento F, os novilhos tinham permanecido durante os meses de julho e agosto em um potreiro onde havia *S. brasiliensis*, *S. heterotrichius* (ambos com evidência de terem sido consumidos), e, em menor quantidade, *S. seloi*. As vacas estavam em um potreiro que tinha grande quantidade de *S. brasiliensis*. Nos estabelecimentos G e H observava-se quase exclusivamente *S. brasiliensis*. Os novilhos do estabelecimento H haviam permanecido, no inverno, em potreiros com bastante *S. brasiliensis*, observando-se, na primavera, plantas que tinham sido consumidas e estavam rebrotando. Existia também, mas em pouca quantidade, *S. heterotrichius*. Nos potreiros onde os animais passavam o inverno, no estabelecimento I, existiam quantidades consideráveis de *S. seloi* e *S. heterotrichius* e, em menor quantidade, *S. brasiliensis*. No estabelecimento J, existiam todas as espécies de *Senecio* mencionadas anteriormente e também *S. leptolobus*.

Sinais clínicos

Os sinais clínicos caracterizam-se por diarreia, tenesmo retal, sintomas nervosos caracterizados por incoordenação e agressivi-

dade. O curso, em geral, entre os primeiros sintomas e a morte, era de 2 a 4 dias, sendo que os sintomas nervosos geralmente observaram-se 24 a 48 horas antes da morte. Alguns animais apresentaram edema de membros e barbeta. Em 1 surto foi observado, além desses sintomas, focinho avermelhado e com descamação. Em alguns casos observou-se somente uma perda de peso progressiva aproximadamente durante 1 mês, com diarreia ou não, até ficar em decúbito esternal 24 horas antes da morte.

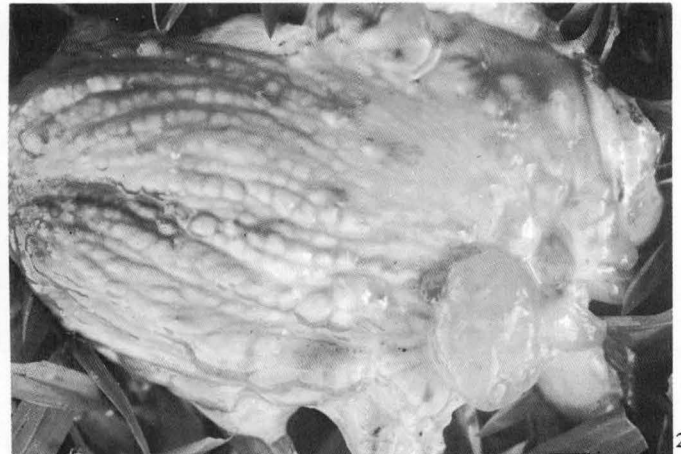
No último surto, além desses sintomas observou-se nos ternos severa ascite.

Patologia

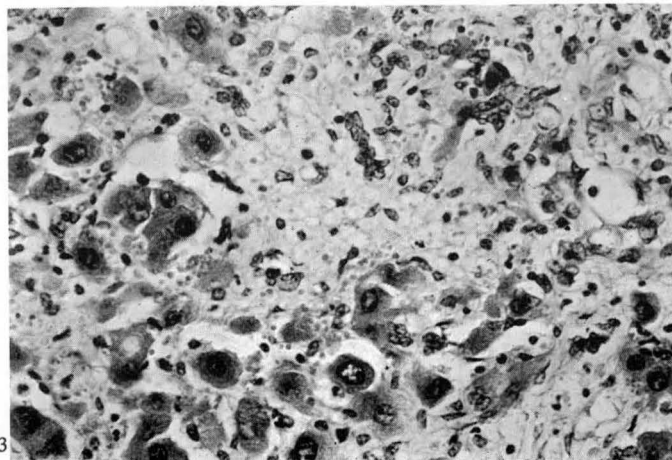
As lesões macroscópicas foram caracterizadas por edemas no mesentério, abomaso e intestino, líquido na cavidade abdominal, hemorragias peri e endocárdicas. O fígado apresentava-se de coloração esbranquiçada ou amarelada, às vezes aumentado de tamanho; ao corte apresentava-se aumentado de consistência e com áreas arredondadas esbranquiçadas, intercaladas com áreas de coloração vermelha (Fig. 1); em alguns casos observaram-se áreas hemorrágicas e proliferação de tecido fibroso na superfície. A vesícula biliar estava aumentada de tamanho, com a parede en-



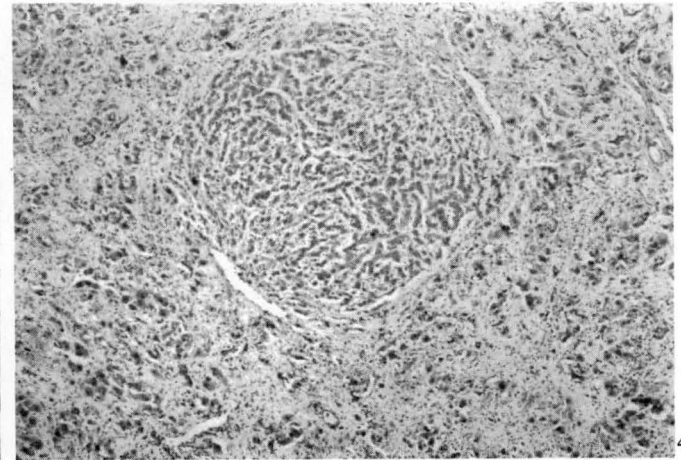
1



2



3



4

Fig. 1. Fígado de uma vaca do estabelecimento I. Severa fibrose caracterizada por áreas esbranquiçadas intercaladas com áreas de coloração vermelha.

Fig. 3. Fígado de uma vaca do estabelecimento E. Severa fibrose, proliferação de células dos ductos biliares, megalocitose e desorganização do parênquima. HE, obj. 20.

Fig. 2. Vesícula biliar de um terneiro do estabelecimento J. Nódulos distribuídos em toda a mucosa; na parte superior observam-se nódulos de maior tamanho.

Fig. 4. Nódulo regenerativo, com hepatócitos de tamanho normal, no fígado de uma vaca do estabelecimento A. No restante do fígado observa-se fibrose difusa e megalocitose. HE, obj. 4.

grossada e edemaciada, apresentando, em 3 casos, nódulos de 2 a 3 mm, distribuídos em toda a mucosa (Fig. 2).

Histologicamente, nos fígados, observou-se espessamento da cápsula de Glisson; desorganização do parênquima; fibrose difusa (Fig. 3), sendo muito marcada nos espaços porta e ao redor de artérias e veias, incluindo a veia centrolobular; e proliferação de células epiteliais dos ductos biliares. Os hepatócitos apresentavam megalocitose caracterizada por aumento do tamanho do citoplasma e do núcleo, no qual encontrava-se a cromatina condensada na periferia (Fig. 3). Em 1 caso, observou-se pigmentação amarelada no citoplasma dos hepatócitos. Alguns hepatócitos apresentavam-se degenerados e necróticos, observando-se, em 3 fígados, nódulos regenerativos arredondados e com hepatócitos aparentemente normais (Fig. 4). Em 3 casos observaram-se extensas áreas de fibrose no parênquima, com ausência de hepatócitos, infiltração de células inflamatórias, neutrófilos e macrófagos com pigmento em um desses casos. Acúmulo de células mononucleares nos espaços porta foi observado em 2 oportunidades.

No estudo histológico das vesículas biliares que macroscopicamente apresentaram lesões nodulares, observou-se que alguns nódulos, geralmente os maiores, eram constituídos por tecido conectivo frouxo coberto por epitélio de aparência normal; outros, geralmente os menores, apresentavam epitélio de aparência adenomatosa, às vezes, com formações císticas e hiperplasia de tecido conectivo denso na lâmina própria.

Quadro 2. Localização e freqüência das lesões de espongiose no SNC de 6 bovinos intoxicados por *Senecio* spp.

Localização	Animais					
	1	2	3	4	5	6
Córtex	+	+	+	+	+	+
Cápsula interna	+	+	+	+	+	+
Tálamo		+	+	+	+	+
Tubérculos quadrigêmeos	+	+		+	+	+
Pedúnculos cerebelares	+			+	+	+
Medula cerebelar			+			+
Ponte				+		
Medula oblonga					+	

No sistema nervoso central de 6 animais observaram-se lesões de espongiose, caracterizadas por microcavitações localizadas na substância branca, no limite entre esta e a substância cinzenta e às vezes na substância cinzenta. A distribuição e freqüência dessas lesões são apresentadas no Quadro 2.

DISCUSSÃO

A ocorrência de diversas espécies de *Senecio* nos estabelecimentos onde ocorreu a doença, as manifestações clínicas e patológicas, assim como a ocorrência das mortes durante um período prolongado de tempo confirmam o diagnóstico de intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos causada pela ingestão de plantas do gênero *Senecio*.

Dentre as espécies de *Senecio* encontradas nas propriedades em que houve surtos de intoxicação, a única comprovadamente tóxica é *S. brasiliensis* (Podestá et al. 1977, Tokarnia & Döbereiner 1984). No entanto, têm sido observados surtos de intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos em bovinos em áreas invadidas por *S. heterotrichius* e *S. selloi* (Real 1984).

A existência de outras espécies de *Senecio*, além de *S. brasiliensis*, como *S. heterotrichius*, *S. cisplatinus*, *S. selloi* e *S. leptolobus*, às vezes encontradas em maior quantidade que *S. brasiliensis*, e com evidências de terem sido consumidas, indicam que, provavelmente, a doença é causada também pela ingestão dessas espécies e que *S. brasiliensis* não é o único causante de intoxicação por *Senecio* em bovinos, na região Sul do Rio Grande do Sul.

Para a determinação da toxicidade dessas espécies de *Senecio*, administraram-se experimentalmente a frangos, resultando tóxicas *S. brasiliensis*, *S. heterotrichius*, *S. cisplatinus* e *S. selloi*, nessa ordem de toxicidade (Méndez et al. 1984), sendo *S. leptolobus* também tóxico mas em menor grau (Méndez et al., dados não publicados). Para bovinos, resultaram letais experimentalmente *S. cisplatinus* a 22,5 g/kg, *S. brasiliensis* a 90 g/kg, *S. heterotrichius* a 180 g/kg e *S. selloi* a 45 g/kg e a 180 g/kg (doses totais) utilizando-se planta dessecada (Méndez et al., dados não publicados). Tais dados evidenciam que essas 4 espécies de *Senecio*, observadas nos estabelecimentos onde ocorreu a doença, participam do quadro de intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos em bovinos. *S. leptolobus* não foi tóxico para bovinos na dose de 180 g/kg, e foi encontrado junto a outras espécies de *Senecio*, em apenas 1 dos estabelecimentos onde ocorreram surtos da doença.

As mortes acontecem de forma esporádica durante um período prolongado de tempo, sendo que, na maioria dos surtos observados, a maior freqüência das mortes verificou-se nos meses de inverno e primavera, mas ocorrendo mortes também em outras épocas do ano. A ocorrência de mortes esporádicas durante um período de vários meses, devidas à intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos, é mencionada por Donald (1957), Fowler (1968) e Méndez et al. (1985). Walker & Kirkland (1981) observaram que mortes esporádicas são mais freqüentes em bovinos adultos e que grupos de mortalidades acontecem mais em animais jovens.

Considerando que os alcalóides pirrolizidínicos causam no fígado uma lesão progressiva, e que os sintomas clínicos podem aparecer alguns meses após a ingestão das plantas que os contêm, é provável que a ingestão de *Senecio* spp. ocorra durante os meses de maio a agosto, período em que elas estão em brotação e a disponibilidade de pastagens diminui consideravelmente. As espécies do gênero *Senecio* são pouco palatáveis e ingeridas pelos bovinos somente sob determinadas condições. Diversos autores consideram que a ingestão das plantas ocorre somente em épocas de carência de forragem (Donald 1957, Karter 1965, Dollahite 1972, Walker & Kirkland 1981), ou em condições climáticas adversas (Dollahite 1972).

Palfrey et al. (1967) sugerem que a ingestão de *Senecio jacobaea* estaria relacionada a carências minerais, e que uma suplementação mineral adequada que supra as necessidades de fósforo, cobalto e cobre ajuda a prevenir a ingestão da planta. Johnson (1982) demonstrou experimentalmente que grupos de bovinos com e sem suplementação mineral foram igualmente susceptíveis à intoxicação por *S. jacobaea*.

A importância do estágio de crescimento de diversas plantas na produção de alcalóides tem sido mencionada por Johnson (1978), para *Senecio jacobaea*, e por Fowler (1968), para *Amsinckia intermedia*. Moraes (1951) determinou que o conteúdo de alcalóides de *Senecio brasiliensis* é maior antes da floração do que durante e após a mesma. Isso, provavelmente, é similar para as outras espécies de *Senecio*, coincidindo o estágio da planta em que há maior concentração de alcalóides com a época provável em que ocorre a ingestão da planta pelos animais.

Deve considerar-se que em nenhum dos estabelecimentos onde ocorreram surtos da doença, existiam ovinos. Considerando que os ovinos consomem normalmente as espécies do gênero *Senecio* e são mais resistentes à intoxicação que os bovinos, podem ser utilizados, em pastoreio conjuntamente com os bovinos, como uma forma viável de profilaxia da intoxicação. O fato de que os

ovinos podem ser usados para controlar espécies de *Senecio*, mas que isso é uma prática perigosa, já que eles também podem sofrer a intoxicação, tem sido mencionado por Donald (1957) e Dollahite (1972). Segundo Bull (1955), a intoxicação em ovinos não é um problema sério, os quais podem consumir grandes quantidades por vários anos sem apresentar sinais de intoxicação, apesar de que podem apresentar alterações nas células hepáticas. No entanto, trabalhos de Mortimer & White (1975) demonstraram a suscetibilidade de ovinos a várias espécies de *Senecio*, salientando que a mesma é 10 vezes menor que para bovinos, e Dollahite (1972) concluiu em seus experimentos que os ovinos precisam 20 vezes mais quantidade de *Senecio* para se intoxicarem que os bovinos.

A ocorrência de um número maior de surtos em alguns anos, poderia ser devida a variações na quantidade de *Senecio* spp. e/ou a carência invernal de forragem mais severa que em outros anos, o que também poderia levar a um consumo excessivo da planta. Harper (1958), em um trabalho de revisão sobre ecologia e controle do "ragwort" (*Senecio jacobaea*), observa que é uma planta cíclica e que pode existir em grandes quantidades durante muitos anos, depois tornar-se escassa ou até mesmo desaparecer da área.

Os sinais clínicos observados nesses surtos foram variáveis, podendo ser agrupados em três grupos principais: a) o quadro clínico mais específico da intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos, caracterizado por sintomatologia nervosa, tenesmo retal, diarreia e um curso clínico de 24 a 72 horas, sendo que alguns animais que apresentam essa sintomatologia podem recuperar-se, voltando a apresentar esses sintomas posteriormente; b) um quadro clínico caracterizado por emagrecimento progressivo, com diarreia ou não, durante aproximadamente 1 mês ou mais, podendo observar-se, antes da morte, os sinais descritos no item anterior, ou os animais permanecem em decúbito até a morte; c) um quadro de ascite, o que foi observado exclusivamente em terneiros no estabelecimento J. Outros sinais clínicos que também podem observar-se são dermatite, devido certamente à fotossensibilização, edemas de membros e barbeta. Essas variações nos sinais clínicos devem ser consideradas do ponto de vista do diagnóstico da doença, já que esta pode ser confundida com diversas enfermidades que cursam com sintomas nervosos, diarreia, emagrecimento progressivo, edemas e ascite ou fotossensibilização.

As alterações encontradas à necropsia, caracterizadas por edemas no mesentério, abomaso e intestinos, líquido na cavidade abdominal, aumento do tamanho e da consistência do fígado, apresentando ao corte áreas esbranquiçadas intercaladas com áreas vermelhas, aumento da vesícula biliar com edema das paredes, ocorrem comumente nas intoxicações por plantas que contêm alcalóides pirrolizidínicos (Bull et al. 1968, Johnson et al. 1984, 1985, Kater 1965). Na vesícula biliar, em 3 casos, foram observados nódulos distribuídos em toda a mucosa, caracterizados por hiperplasia do tecido conectivo da lâmina própria coberto por epitélio que, em algumas ocasiões, apresentava-se de aspecto adenomatoso e com formações císticas. Essa alteração é citada também por Walker & Kirkland (1981).

As lesões histológicas observadas constantemente no fígado caracterizam-se por megalocitose, fibrose e proliferação de células epiteliais dos ductos biliares, sendo similares às descritas por vários autores nas intoxicações por alcalóides pirrolizidínicos (Bull et al. 1968, McLean 1970). Foram observados também nódulos regenerativos arredondados e com hepatócitos aparentemente normais, no fígado de 3 animais. Esses nódulos regenerativos poderiam ser devidos à ingestão de pequenas quantidades de espécies de *Senecio* spp. em anos consecutivos, já que foram ob-

servados preferentemente em vacas. Segundo McLean (1974), quando, após a ingestão de uma determinada quantidade de alcalóides pirrolizidínicos, o animal sobrevive durante vários meses, podem desenvolver-se esses nódulos regenerativos e carcinomas. Outras lesões observadas com frequência variável foram extensas áreas do parênquima hepático invadidas por tecido fibroso com ausência de hepatócitos e infiltração de células inflamatórias e macrófagos; pigmentação no citoplasma dos hepatócitos e nos macrófagos, hepatócitos degenerados e necróticos.

Em 6 bovinos, de 10 estudados, foram observadas lesões de espongiose no sistema nervoso central (SNC), caracterizadas por microcavitações na substância branca ou no limite entre esta e a substância cinzenta, e às vezes na substância cinzenta, localizadas, preferentemente, na córtex, na cápsula interna, no tálamo e nos tubérculos quadrigêmeos. Lesões similares são observadas em intoxicações por plantas que contêm alcalóides pirrolizidínicos (Kater 1965, Walker & Kirkland 1981, Méndez et al. 1985), mas também em outras formas de doenças hepáticas, sendo que Hooper et al. (1974) demonstraram, através de experimentos com alcalóides pirrolizidínicos, que essas lesões do SNC são secundárias à insuficiência hepática, devidas provavelmente à hiperamonemia e não ao efeito direto dos alcalóides ou seus metabólitos no tecido nervoso.

A observação de diversos surtos de intoxicação por *Senecio* spp. permite estabelecer este grupo como plantas tóxicas importantes para bovinos no Rio Grande do Sul. O fato de as mortes ocorrerem em forma esporádica, muitas vezes após o mês de novembro, quando já não se observa mais a planta, e com sintomatologia variada, permite supor que muitos casos de intoxicação passem despercebidos para produtores e veterinários. Em consequência, é importante estabelecer o diagnóstico sistemático da doença, para o qual deverão considerar-se os dados epidemiológicos, as alterações clínicas e de necropsia e a confirmação no laboratório mediante a observação das lesões histológicas do fígado.

REFERÊNCIAS

- Bull L.B. 1955. The histological evidence of liver damage from pyrrolizidine alkaloids: Megalocytosis of the liver cells and inclusion globules. *Aust. Vet. J.* 31: 33-40.
- Bull L.B. 1961. Liver diseases in livestock from intake of hepatotoxic substances. *Aust. Vet. J.* 37: 126-130.
- Bull L.B., Culvenor C.C.J. & Dick A.T. 1968. The pyrrolizidine alkaloids. Their chemistry, pathogenicity and other biological properties. North-Holland Publ., Amsterdam, p. 293.
- Carvalho G.S.T. & Maugé G.C. 1946. Ação tóxica do *Senecio brasiliensis* Lessing, fam. Compositae. *Revta Fac. Med. Vet., S. Paulo*, 3: 131-136.
- Craig A.M., Meyer C., Koller L.D. & Schmitz J.A. 1978. Serum enzyme tests for pyrrolizidine alkaloid toxicosis. *Am. Ass. Veterinary Laboratory Diagnosticians* 21: 161-178.
- Curial O. & Guimarães J.P. 1958. Cirrose hepática enzoótica no cavalo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de J.*, 56: 635-644.
- Dollahite J.W. 1972. The use of sheep and goats to control *Senecio* poisoning in cattle. *Southwestern Vet.* 25: 223-226.
- Donald L.G. 1957. Ragwort poisoning. *Agriculture* 64: 131-133.
- Fowler M.E. 1968. Pyrrolizidine alkaloid poisoning in calves. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 152: 1131-1137.
- Harper J.L. 1958. The ecology of ragwort (*Senecio jacobaea*) with special reference to control. *Herb. Abstr.* 28(3): 151-157.
- Hooper P.T. 1978. Pyrrolizidine alkaloid poisoning-pathology with particular reference to differences in animal and plant species, p. 161-176. In: Keeler R.F., Van Kampen K.R. & James L.F. (ed.)

- Effects of poisonous plants on livestock. Academic Press, New York.
- Hooper P.T., Best S.M. & Murray D.R. 1974. Hyperammonaemia and spongy degeneration of the brain in sheep affected with hepatic necrosis. *Res. Vet. Sci.* 16: 216-222.
- Johnson A.E. 1978. Tolerance of cattle to Tansy Ragwort (*Senecio jacobaea*). *Am. J. Vet. Res.* 39: 1542-1544.
- Johnson A.E. 1982. Failure of mineral-vitamin supplements to prevent tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) toxicosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 43: 718-723.
- Johnson A.E. & Molyneux R.J. 1984. Toxicity of threadleaf groundsel (*Senecio douglasii* var. *longilobus*) to cattle. *Am. J. Vet. Res.* 45: 26-31.
- Johnson A.E., Molyneux R.J. & Stuart L.D. 1985. Toxicity of Riddell's groundsel (*Senecio riddellii*) to cattle. *Am. J. Vet. Res.* 46: 577-582.
- Kater J.C. 1965. Cotton fireweed (*Senecio quadridentata*) poisoning in cattle. *Vet. Inspector NSW* 29: 45-47.
- McLean E.K. 1970. The toxic action of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. *Pharmacol. Rev.* 22: 429-483.
- McLean E.K. 1974. *Senecio* and other plants as liver poisons. *Isr. J. Med. Sci.* 10: 436-440.
- Méndez M.C., Riet-Correa F. & Schild A.L. 1984. Determinação da toxicidade em frangos de 4 espécies de *Senecio*. 19º Congr. Bras. Med. Vet., Belém, p. 329.
- Méndez M.C., Riet-Correa F., Schild A.L. & Garcia J.T.C. 1985. Intoxicação por *Echium plantagineum* (Boraginaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 5(2): 57-64.
- Modime M. & Ferreira P.C. 1966. Alcalóides do *Senecio brasiliensis* Less. *Revta Fac. Farm. Bioquím.*, São Paulo, 4(1): 13-44.
- Moraes E.C. 1951. Contribuição ao estudo químico-toxicológico do *Senecio brasiliensis* Less. Tese de Livre Docência, Fac. Farmácia Odontol, USP, São Paulo. 79 p.
- Mortimer P.H. & White E.P. 1975. Toxicity of some composite (*Senecio*) weeds. *Proc. 28th N.Z. Weed and Pest Control Conf.*, p. 88-91.
- Muth O.H. 1968. Tansy Ragwort (*Senecio jacobaea*), a potential menace to livestock. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 153: 310-312.
- Nazário W. & Portugal M.A.S.C. 1972. Intoxicação natural de bovinos pelo *Senecio brasiliensis* Less. Observação clínica – nota prévia. *Anais XIII Congr. Bras. Med. Vet.*, Brasília, p. 356.
- Neffen M. & Pachoud J.C. 1979. Intoxicación por alcalóides pirrolizidínicos en bovinos. *Gaceta Veterinaria*, B. Aires, 41: 748-749.
- Okada K.A. & Carrillo B.J. 1975. *Senecio tweediei* H. et A., planta tóxica para el ganado bovino en la Provincia de Buenos Aires. *Revta Fac. Agron. Univ. Nac. La Plata* 51: 43-48.
- Palfrey G.D., MacLean K.S. & Langille W.M. 1967. Correlation between incidence of ragwort (*Senecio jacobaea* L.) poisoning and lack of mineral in cattle. *Weed Res.* 7: 171-175.
- Podestá M., Tórtora J.C., Moyna P., Izaguirre P.R., Arrilaga B. & Altamirano J. 1977. Seneciosis en bovinos, su comprobación en el Uruguay. *Veterinaria (Uruguai)* 12: 97-112.
- Real C. 1986. Comunicação pessoal (Fac. Med. Vet., UFRGS. Porto Alegre, RS).
- Tilt S.E. 1969. Ragwort toxicosis in a heifer. *Can. Vet. J.* 10: 302-306.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1984. Intoxicação experimental em bovinos por *Senecio brasiliensis*. *Pesq. Vet. Bras.* 4(2): 39-65.
- Walker K.H. & Kirkland P.D. 1981. *Senecio lautus* toxicity in cattle. *Aust. Vet. J.* 57: 1-7.