

ISSN 0100-736X

Volume 7 Número 3  
Jul/Set 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, Isaías A. de Oliveira. **Editores Adjuntos:** Severo Sales de Barros, Osmane Hipólito, Jerome Langenegger, Hugo Barboza de Rezende, Adair 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); tel.: (021) 782-1081 e 782-1082.

**PROGRAMA DE APOIO A PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS**

M C T  CNPq  finep

---

A Revista conta com a colaboração da Embrapa e UFRRJ

Figura da capa: A planta tóxica *Nierembergia veitchii* (fam. Solanaceae), a causa da calcinose enzoótica de ovinos no Rio Grande do Sul. (Riet-Correa et al., p. 85)

*Cover illustration: The poisonous plant Nierembergia veitchii (fam. Solanaceae), the cause of enzootic calcinosis in sheep in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. (Riet-Correa et al., p. 85)*

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

Julho/Setembro 1987

Número 3

## SUMÁRIO

<b>Pitiose cutânea em eqüinos no Rio Grande do Sul.</b> <i>M.N. Santos, L.L. Metzdorf, M.M. Braga &amp; C.A. Wolle</i> .....	57 - 61
<b>Níveis de anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados contra raiva.</b> <i>P.M. Roehle, A.C. Cunha &amp; A. King</i> .....	63 - 65
<b>Intoxicação experimental por <i>Vernonia mollissima</i> (Compositae) em caprinos.</b> <i>L. Stolf, A. Gava &amp; C.H. Tokarnia</i> .....	67 - 77
<b>Sorotipos de <i>Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae</i> isolados de suínos no Brasil.</b> <i>I.A. Piffer, M.A.V.P. Brito, J.R.F. Brito &amp; D.E.S.N. Barcellos</i> .....	79 - 83
<b>Enzootic calcinosis in sheep caused by the ingestion of <i>Nierembergia veitchii</i> (Solanaceae).</b> [Calcinose enzoótica em ovinos causada pela ingestão de <i>Nierembergia veitchii</i> (Solanaceae).] <i>F. Riet-Correa, A.L. Schild, M.C. Méndez, R. Wasserman &amp; L. Krook</i> ..	85 - 95
<b>Efeito do leite materno sobre as lesões peridentárias da “cara inchada” em bezerros.</b> <i>J. Döbereiner, I.V. Rosa &amp; A.A. Lazzari</i> .....	97 - 99
Resumos 22-31 .....	v-vi
Tópico: Tratamento da tuberculose bovina com Hidrazida .....	vii

## CONTENTS

Subcutaneous pythiosis in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. <i>M.N. Santos, L.L. Metzdorf, M.M. Braga &amp; C.A. Wolle</i> .....	57 - 61
Neutralizing antibody levels in cattle vaccinated against rabies. <i>P.M. Roehle, A.C. Cunha &amp; A. King</i> .....	63 - 65
Experimental poisoning of goats by <i>Vernonia mollissima</i> (Compositae). <i>L. Stolf, A. Gava &amp; C.H. Tokarnia</i> .....	67 - 77
Serotypes of <i>Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae</i> isolated from swine in Brazil. <i>I.A. Piffer, M.A.V.P. Brito, J.R.F. Brito &amp; D.E.S.N. Barcellos</i> .....	79 - 83
Enzootic calcinosis in sheep caused by the ingestion of <i>Nierembergia veitchii</i> (Solanaceae). <i>F. Riet-Correa, A.L. Schild, M.C. Méndez, R. Wasserman &amp; L. Krook</i> .....	85 - 95
Influence of the milk on periodontal lesions of “cara inchada” in calves. <i>J. Döbereiner, I.V. Rosa &amp; A.A. Lazzari</i> .....	97 - 99

ISSN 0100736X

Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro, v.7, n.3, p.57-99, jul./set. 1987

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)

1st Congress of Toxicology in Developing Countries, Buenos Aires, Argentina, November 16-21,  
1987  
(Information: Dr. José A. Castro, Centro de Investigaciones, Zufriategui 4380, Villa Martelli, Pcia Buenos  
Aires, Argentina; tel. 761-0031/0531, ext. 239)

40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, São Paulo, SP, 10 a 16.7.1988

(Informações: SBPC, Av. Pedroso de Moraes 1512, São Paulo, SP 05420; Cx. Postal 11.008, São Paulo, SP 05499; tel.: (011) 211-0495, 212-0740; telex 1154164 SBHC)

10th Congress of the International Pig Veterinary Society, Rio de Janeiro, RJ, August 14-17, 1988  
(Secretaria do Congresso: Congrex do Brasil, Rua do Ouvidor 60/614, Rio de Janeiro, RJ 20040; tel.: (021)  
224-6080; telex (021) 320891 CERT BR)

REVISTAS INCLUÍDAS NA PREPARAÇÃO DE RESUMOS  
PARA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

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

## RESUMOS

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

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

### DOENÇAS INFECCIOSAS

22. Bersano J.G., Peixoto Z.M.P., Farinha F.B.N., Silva M.R.P. & Meira J. 1985. **Diagnóstico precoce da peste suína clássica através de biópsia de amídalas.** [Tonsil biopsy for the early diagnosis of hog cholera.] *Biológico, S. Paulo, 57(7):181-184.* Seção de Doenças de Suínos, Eqüinos e Pequenos Mamíferos, Inst. Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves 1252, C.P. 5185, São Paulo, SP 04014.

Descreve-se o diagnóstico precoce da peste suína clássica, através de biópsia de amídalas, em suínos procedentes de propriedades com histórico de peste suína clássica e/ou suínos suspeitos. Foram examinados 258 materiais dos quais somente 41 se mostraram negativos, tendo este trabalho sido iniciado em 1979. A técnica empregada para diagnóstico foi de imunofluorescência direta (IFD), aplicada a cortes histológicos de material de biópsia de amídalas.

23. Kotait I., Cunha E.M.S., Queiroz L.H., Peixoto Z.M.P. & Souza M.C. 1978. **Doença de Aujeszky no estado de São Paulo: inquérito sorológico em plantéis de reprodutores suínos realizados no período de 1985, 1986.** [Aujeszky's diseases in the State of São Paulo: serological survey in reproductive herds realized during the period from 1985 to 1986.] *Arqs. Inst. Biol., S. Paulo, 53(1-4):71-73.* Inst. Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves 1252, C.P. 4185, São Paulo, SP 04014.

Pesquisou-se a presença de anticorpos neutralizantes para o vírus a doença de Aujeszky, em 100% dos animais pertencentes a 15 granjas de reprodutores registradas na Associação Paulista de Criadores de Suínos. Dos 10.523 soros coletados, no período de julho de 1985 a junho de 1986, 101 revelaram-se positivos e pertenciam a duas propriedades situadas nos municípios de Jundiá e Cerqueira César. As porcentagens encontradas foram 93,0 e 3,3, respectivamente. Recomenda-se a continuidade do acompanhamento sorológico das granjas reprodutoras, como principal medida para o controle da doença de Aujeszky no Estado de São Paulo.

24. Baldassi L., Fernandes Filho M., Moulin A.A.P., Hipolito M. & Murakami T.O. 1986. **Estudo da sensibilidade in vitro dos principais agentes bacterianos isolados de mastites subclínicas na bacia leiteira de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo.** [In vitro sensibility study of the main bacterial agents isolated from sub-clinical mastitis in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.] *Arqs Inst. Biol., S. Paulo, 53(1-4):55-63.* Seção de Bacteriologia Animal, Inst. Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves 1252, C.P. 4185, São Paulo, SP 04014.

Foram realizados antibiogramas com 954 cepas bacterianas, provenientes de 926 amostras de leite, oriundas de animais portadores de mastites subclínicas evidenciadas pela prova do CMT. Os antibióticos testados fazem parte do arsenal terapêutico presente no mercado e os maiores índices de sensibilidade detectados foram para os *Staphylococcus* à gentamicina, cloxacilina, espiramicina, kanamicina e novobiocina; para os *Streptococcus*, à cloxacilina, penicilina, espiramicina, cloranfenicol e lincomicina; para *Corynebacterium*, à gentamicina, cloranfenicol, espiramicina,

neomicina, novobiocina, penicilina, cloxacilina, lincomicina, kanamicina, streptomina e polimixina B; para Enterobactérias, à gentamicina, kanamicina e polimixina B; para *Pseudomonas*, a somente polimixina B; para os demais bastonetes Gram-negativos não fermentadores, à gentamicina; para os *Micrococcus*, à gentamicina, penicilina e polimixina B e, finalmente, para a *Pasteurella*, ao cloranfenicol e neomicina. A realização do antibiograma mostrou-se de grande importância prática, visto que, para cada grupo bacteriano, a sensibilidade às drogas testadas foi variável. Entre estas, destacaram-se seis: cloxacilina, gentamicina, polimixina B, cloranfenicol, espiramicina e penicilina. Associando-se o fato de que a prevalência dos agentes foi para bactérias Gram-positivas, verificou-se que a cloxacilina e a espiramicina foram os antibióticos que, *in vitro*, apresentaram os melhores resultados.

25. Barcellos T.F.S., Silva N. & Marques Junior A.P. 1987. **Mamite caprina em rebanhos próximos a Belo Horizonte, Minas Gerais. I. Etiologia e sensibilidade a antibióticos. II. Métodos de diagnóstico.** [Goat's mastitis in herds near Belo Horizonte, Minas Gerais. I. Aetiology and antibiotic sensibility. II. Diagnostic methods.] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 39(2):307-315.* Esc. Vet., Univ. Fed. Minas Gerais, C.P. 567, Belo Horizonte, MG 30161.

A ocorrência de mamite em cabras em rebanhos localizados nas proximidades de Belo Horizonte, Minas Gerais, foi estudada através de testes a nível de campo (exame clínico e California Mastitis Test - CMT) e laboratoriais (determinação da etiologia dos agentes bacterianos, contagem de células somáticas e sensibilidade a antibióticos). Encontraram-se das 157 amostras de leite examinadas, 40 CMT positivas e com contagens acima de 5.000.000 de células/ml, correspondendo a 25,5%. O agente bacteriano mais frequentemente isolado foi *Staphylococcus aureus*, ocorrendo em 42,65% dos positivos. Todas as bactérias testadas mostraram-se sensíveis à neomicina a ao nitrofurano.

### DOENÇAS PARASITÁRIAS

26. Maia A.A.M. & Guimarães M.P. 1986. **Variação estacional de infecções helmínticas em vacas de corte e efeitos de Ivermectrin em diferentes intervalos.** [Seasonal variation in gastrointestinal helminth infection of beef cows and effect of Ivermectrin at different intervals.] *Pesq. Agropec. Bras. 21(10): 1085-1088.* Depto Parasitologia, Inst. Ciênc. Biológicas, Univ. Fed. Minas Gerais, Cx. Postal 567, Belo Horizonte, MG 30000.

Foram utilizadas 55 vacas da raça nelore com idade entre 5 e 8 anos, naturalmente infectadas por nematódeos gastrintestinais, divididas em 5 grupos de 11 animais; um grupo permaneceu como controle, enquanto os outros foram tratados com Ivermectrin, na dose de 200 mcg/kgpv. O medicamento, aplicado em intervalos de 60, 75 e 90 dias, interferiu na carga parasitária subclínica dos animais, o que não ocorreu com o tratamento a cada 120 dias. Os resultados das culturas de fezes e das contagens de OPG, realizadas mensalmente, mostraram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre a carga parasitária dos

bovinos na estação seca e chuvosa; nas coproculturas, as larvas de *Cooperia* foram as mais freqüentes, seguidas, respectivamente, das de *Haemonchus*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*. Os autores lembram, que as infecções subclínicas das vacas dos 5 grupos provavelmente não interferiram na produção de leite e carne, sendo a administração do anti-helmíntico discutível. Citam ainda os trabalhos realizados por outros autores, em que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no ganho de peso e na produção leiteira de animais com infecções subclínicas tratados com anti-helmínticos. CHT

27. Farias N.A.R., Gonzales J.C. & Saibro J.C. 1986. **Antibiose e antixenose entre forrageiras e larvas de carrapato-de-boi.** [Antibiosis and antixenosis among forage species and larvae of cattle tick.] *Pesq. Agropec. Bras.* 21(12):1313-1320. Av. Duque de Caxias 170C/202, Pelotas, RS 96100.

As leguminosas *Stylosanthes scabra* Vog. e *Stylosanthes viscosa* Sw. e as gramíneas capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.), capim-braquiária (*Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard) e capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), cultivadas em casa de vegetação, foram testadas quanto às suas propriedades de antibiose e antixenose com larvas de carrapato-de-boi (*Boophilus microplus* Canestrini, 1887). Em dois experimentos similares, foram colocadas 100 larvas em cada planta, e os efeitos foram avaliados após 5, 10 e 20 dias de contato larva/forrageira. O capim-gordura, *S. viscosa* e *Scabra*, espécies dotadas de pêlos epidérmicos glandulares produtores de secreções viscosas, exerceram mecanismos de antixenose (repelência) e de antibiose (provocando a morte ou mantendo as larvas presas às secreções) com as larvas. A redução máxima da população de larvas potencialmente infestantes ocorreu aos 20 dias de contato larva/forrageira. Dentre essas espécies potencialmente úteis ao controle biológico do carrapato, destacou-se o capim-gordura, que reduziu em 95% a população de larvas infestantes. O capim-elefante e o capim-braquiária revelaram pouca ou nenhuma interferência no comportamento das larvas.

28. Leite R.C., Nunes V.A., Coelho A.M.B., Chquiloff M.A.G. & Nunes J.J. 1987. **Patologia da infecção do ouvido por *Railletia auris* (Leidy, 1872) Trouessart, 1902 (Acari, Mesostigmata). II. Achados bacteriológicos.** [Pathology of the ear mite *Railletia auris* (Leidy 1872) Trouessart, 1902 (Acari, Mesostigmata). II. Bacteriological aspects.] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 39(2):325-332. Esc. Vet., Univ. Fed. Minas Gerais, C.P. 567, Belo Horizonte, MG 30161.

Descreve-se a flora bacteriana associada à infecção por *Railletia auris* no sistema auditivo (SA) de 60 bovinos azebuados, abatidos em matadouro sediado no estado de Minas Gerais. Os isolamentos foram feitos da tuba faringo-timpânica (TFT), da cavidade timpânica (CT) e do conduto auditivo externo (CAE), correlacionados com a presença ou ausência de lesões macroscópicas e microscópicas nessas porções. As bactérias isoladas do CAE, CT e TFT incluem-se, na maioria dos casos, no grupo das não-patogênicas ou patogênicas facultativas. As dos gêneros *Bacillus*, *Micrococcus* e do grupo bastonetes Gram-negativos, por terem sido isoladas das três porções de SA, lesadas ou não, foram consideradas como constituintes normais da flora bacteriana do

ouvido de bovinos. *Corynebacterium pyogenes* e as bactérias dos gêneros *Proteus* e *Pseudomonas* só foram isoladas de CAE e CT lesados.

29. Brito D.B., Francis M., Freire N.M.S. & Gomes D.C. 1987. **Prevalência e patogenicidade causada por *Oesophagostomum* (Molin, 1861) em suínos no estado do Rio de Janeiro.** [Prevalence and pathogenicity of *Oesophagostomum* in swine of Rio de Janeiro State.] *Arqs. Flum. Med. Vet., Rio de J.*, 2(2):47-48. Depto Doenças Parasitárias, Univ. Fed. Fluminense, Rua Vital Brazil Filho 64, Niterói, RJ 24000.

No período de março a novembro de 1977, foram necropsiados 60 suínos de ambos os sexos, nascidos e criados no estado do Rio de Janeiro. A prevalência de *Oesophagostomum dentatum* foi de 68,3% e 63,3% de *O. quadrispinulatum*, com 92,7% de associação destas parasitoses. As lesões causadas por *Oesophagostomum* spp., foram estudadas, sendo verificado que seu sítio de localização situava-se ao nível do intestino delgado e grosso, onde os nódulos eram mais numerosos, com diâmetros maiores. Este aspecto correlaciona-se à faixa etária e ao sexo dos hospedeiros.

30. Batista Neto R., Lopes C.W.G. & Grisi L. 1987. **Macromerontes de um coccidia no abomaso de ovinos.** [Macromeronts of a coccidia in the abomasum of sheep.] *Arqs Flum. Med. Vet., Rio de J.*, 2(2):49-50. Depto Biologia Animal, Univ. Fed. Bahia, Av. Ademar de Barros 500, Ondina, Salvador, BA 40000.

Num total de 10 ovinos utilizados num trabalho experimental com tricostrongilídeos, à necrópsia, 6 dos animais tinham áreas circunscritas de coloração branco-amareladas na mucosa do abomoso, medindo aproximadamente de 2 a 3 mm de diâmetro. Microscopicamente, estas áreas foram constituídas por macromerontes em diversos estágios de desenvolvimento, localizados na lâmina própria das vilosidades. Em alguns deles observou-se a presença de merozoítas em sua fase final de desenvolvimento. Com base na descrição das formas endógenas descritas previamente caracterizou-se este parasita como *Eimeria gilruthi*.

31. Souza M.C. & Serra Freire N.M. 1987. **Flutuação da parasitemia por *Trypanosoma vivax* em infecções experimentais de ruminantes domésticos.** [Parasitaemic fluctuations in *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* experimental infection in domestic ruminants.] *Arqs Flum. Med. Vet., Rio de J.*, 2(2):51-54. Fundação Univ. Fed. Piauí, Campus Universitário do Iningá, Teresina, PI 64000.

Infecções experimentais foram feitas em bovinos, ovinos e caprinos com *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* Ziemann, 1905 objetivando o estudo da flutuação da parasitemia e o curso da infecção. Os 10 ovinos, 9 bovinos e 3 caprinos foram acompanhados diariamente pelo exame de esfregaços sanguíneos finos corados pelo método Giemsa e pesquisa de formas tripomastigotas em tubos heparinizados de micro-hematócrito. Observaram-se períodos de incubação que variaram entre 2 e 31 dias. As parasitemias foram bastante flutuantes, inclusive com períodos de ausência de flagelados no sangue periférico que variou entre 1 e 58 dias para bovinos, 1 a 17 dias para caprinos e 1 a 12 dias para ovinos; em função do curso das infecções, foram assinaladas três formas de evolução: aguda, subaguda e crônica.

## TRATAMENTO DA TUBERCULOSE BOVINA COM HIDRAZIDA

O abate dos bovinos infectados por *Mycobacterium bovis* é, sem dúvida, o método mais rápido e eficiente pelo qual se pode erradicar a tuberculose de um rebanho; mas sua adoção só é possível se houver no País um programa oficial de indenização dos animais doentes e a possibilidade de reposição destes por bovinos procedentes de rebanhos indenes.

Como no Brasil não houve e não há atualmente condições de indenizar o sacrifício de bovinos tuberculosos, tornou-se hábito vender os animais "reagentes" para um marchante que os revendia para outros fazendeiros, disseminando, desta forma, a doença progressivamente. Esta prática, infelizmente, ainda ocorre nas bacias leiteiras do País por falta, também, da necessária educação sanitária dos pecuaristas.

O tratamento terapêutico da tuberculose bovina tornou-se o meio mais eficiente de combater a doença em alguns países cuja economia não suporta elevados gastos com sacrifício e a indenização dos animais infectados.

O tratamento da tuberculose bovina com Hidrazida no Brasil, mormente nas bacias leiteiras entre as cidades do Rio de Janeiro, São Paulo e Belo Horizonte, já se constitui prática amplamente aceita pelo fazendeiro, porque o gasto com o medicamento (50 dólares) oscila entre 10 e 15% do valor comercial da vaca. Isto representa uma perda menor do que a desvalorização do animal na venda ao marchante por 20 a 30% abaixo do valor comercial.

Sob o ponto de vista sanitário, a cura da tuberculose, através do tratamento com Hidrazida no próprio foco, é altamente recomendável pois evita a venda dos "reagentes" e conseqüentemente a propagação da doença para outros rebanhos.

A eficiência do tratamento alcança índices em torno de 95% de curas da tuberculose; mas, para tanto, deve haver uma estreita colaboração entre o fazendeiro e o médico-veterinário na execução de um conjunto de providências, a saber:

1) *Fazer o diagnóstico alérgico da tuberculose* em todos os bovinos da fazenda, incluindo desde os bezerros recém-nascidos até os velhos bois de carro, preferencialmente pela tuberculinização comparada (simultânea) com tuberculinas PPDs bovina e aviária. Nos animais suspeitos e negativos do rebanho, a tuberculinização deve ser repetida 60 dias depois, para assim detectar os que na primeira já se encontravam infectados mas ainda eram "reagentes negativos". Numa 3ª tuberculinização, com intervalo de mais 60 dias, todos os animais devem estar negativos desde que na primeira tenham sido reconhecidos e eliminados os animais portadores de "tuberculose aberta". Num foco de tuberculose é importante assegurar que os animais considerados negativos realmente não estão infectados.

2) *Separar os bovinos infectados dos sadios*. Embora a tuberculose não seja altamente contagiosa, é necessário separar quanto antes os "reagentes", não permitindo que estes toquem os animais sadios através de cercas ou comam e bebam nos mesmos locais. O estábulo e os utensílios devem ser rigorosamente desinfetados logo após a separação com soluções a base de formol ou cresóis.

3) *Providências devem ser tomadas para afastar os gatos e submeter ao exame da tuberculose os empregados* que lidaram diretamente com o gado, sem esquecer os adolescentes que, frequentemente, auxiliam nas lidas do estábulo, por serem estes mais sensíveis à infecção por *M. bovis* do que pessoas adultas.

4) *A terapia com Hidrazida*. O tratamento consiste em administrar, por via oral, a Hidrazida (hidrazida do ácido isonicotínico), sob forma de um pó branco cristalizado, na proporção de 25 mg/kg de peso vivo, a cada animal em duas fases, ou seja, uma série de 60 doses em dias consecutivos (durante 2 meses) e o rescaldo que consiste em fornecer a mesma dose 3 vezes por semana (2ª, 4ª e 6ª feira) perfazendo outro total de 60 aplicações (durante 4 meses e 21 dias). Exemplificando, uma vaca de 400 kg de peso vivo recebe 10 g de Hidrazida por dose e o gasto total do medicamento (120 doses) é de 1,2 kg. Para cada diferença de 40 kg de peso animal, aumenta-se a dose em 1 g.

5) *Cuidados a serem tomados durante a medicação*. É importante observar se cada animal ingere a dose do medicamento. Prático é prender os animais no canzil ou na corrente e fornecer a cada um aproximadamente 1 kg de ração concentrada no qual, no ato, foi acrescido a dose de Hidrazida de acordo com o peso do animal. Deve-se evitar de que a vaca vizinha coma a ração da outra. Algumas vacas mestiças, no início do tratamento, se negam a comer a mistura. Nesta circunstância basta aumentar a quantidade da ração concentrada para diluir e disfarçar a presença do medicamento.

Durante o período de medicação não é recomendado tuberculinizar os animais, pois os resultados podem ser falsos.

Não devem ser tratadas as vacas que comprovadamente tenham tuberculose localizada no úbere, diagnosticável clinicamente pelo aspecto dos linfonodos retromamários e processos nodulares crônicos na glândula mamária. Alguns animais clinicamente muito fracos (tuberculose muito evoluída) podem não resistir ao tratamento e morrem nas primeiras 2 semanas.

Durante o período de tratamento os bovinos melhoram de aspecto, mas a cura só pode ser assegurada pela dessensibilização alérgica. Recomenda-se fazer a primeira tuberculinização 30 dias após o término da medicação e depois em intervalos de 2 a 3 meses. Os animais tornam-se lentamente negativos; alguns, por vezes, demoram até 1 ano para reagirem negativamente. É recomendável registrar em ficha o declínio progressivo da reação alérgica. A causa desta negatificação irregular está ligada ao tamanho da lesão caseosa e sua absorção pelo organismo, após a morte de *M. bovis* na lesão.

Considera-se curado o bovino que, no teste alérgico comparativo, apresentar um aumento de espessura da dobra da pele, na região do omoplata, inferior a 3 mm.

Assegura-se o saneamento da tuberculose fazendo-se ainda duas tuberculinizações do rebanho, com intervalos de 6 meses e depois anualmente, como vigilância sanitária.

É importante não administrar doses muito maiores da Hidrazida, pois esta poderá causar incoordenação motora e paralisia aos animais. Em caso deste acidente terapêutico é necessário suspender a medicação até que o animal volte ao normal e depois prosseguir com o tratamento na dosagem de 25 mg/kg de peso vivo.

O tratamento não afeta a vida reprodutiva da vaca, inclusive a gestação. Também não torna resistente *M. bovis* como ocorre com *M. tuberculosis* no tratamento da tuberculose humana.

JEROME LANGENEGGER

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

# PITIOSE CUTÂNEA EM EQUINOS NO RIO GRANDE DO SUL<sup>1</sup>

MURILO NOGUEIRA dos SANTOS<sup>2</sup>, LUCIANO LUIZ METZDORF<sup>3</sup>, MARCOS MOREIRA BRAGA  
e CARLOS ALBERTO WOLLE<sup>4</sup>

**ABSTRACT.**- Santos M.N., Metzdorf L.L., Braga M.M. & Wolle C.A. 1987. [Cutaneous pythiosis in horses from Rio Grande do Sul, Brazil.] Pitiose cutânea em equínos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(3): 57-61. Depto Patologia, Univ. Fed. Sta Maria, 97119 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Seventeen cases of Pythiosis in horses from Rio Grande do Sul, Brazil, are described. The lesions consisted of subcutaneous granulomas in the limbs, ventral thoracoabdominal wall and face. Specimens from the lesions were obtained through biopsy or at post-mortem examination. The disease is caused by the *Pythium* sp., and yeast-like Protista organism and the lesions are similar to the cutaneous Habronimiasis. Most cases of Pythiosis were observed in summer and the characteristic lesions consisted of an exuberant chronic inflammatory reaction crisscrossed by numerous irregular channels containing a central yellow and firm necrotic core (kunker). A presumptive diagnosis of Pythiosis was made in H & E preparations based on the findings of linear or round spaces in the necrotic areas which represented ghost images of the organism. Identification of the fungal elements was achieved with the use of silver stains (all cases), direct examination (2 cases) and cultures (2 cases). The morphology of the agent and histopathological lesions in all cases are identical and permit the etiologic diagnosis even in non-cultured lesions.

**INDEX TERMS:** *Pythium* sp., subcutaneous pythiosis, horses, granulomatous lesions, pathology.

**SINOPSE.**- Foram diagnosticados 17 casos de pitiose em lesões granulomatosas dos membros, região toracoabdominal ventral e face, obtidas por biópsia e necropsia de equínos do Rio Grande do Sul, Brasil. A doença é causada pelo organismo *Pythium* sp., do reino protista, que provoca lesões semelhantes àquelas da habronemíase cutânea e ocorre, principalmente, nos meses de verão. As lesões caracterizam-se por proliferações inflamatórias exuberantes, com fistulação de onde sai material necrótico amarelado, de consistência firme. O diagnóstico foi feito através da verificação da imagem negativa de elementos filamentosos tubuliformes nas áreas necróticas, vistas nas preparações coradas pela hematoxilina e eosina, pela sua evidenciação nas impregnações pela prata, visualização em exame direto e por cultura do agente de material de dois animais. A semelhança das lesões em todos os casos assegurou o diagnóstico de pitiose.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO.** *Pythium* sp., pitiose equína, cavalo, granuloma cutâneo, patologia.

## INTRODUÇÃO

O termo Pitiose foi proposto por Miller (1983a) para denominar as lesões granulomatosas cutâneas dos equínos, causadas pelo organismo filamentosso tubuliforme *Pythium* sp., antes denominado *Hyphomyces destruens*.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 16 de março 1987.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97119 Santa Maria, Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup> Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

<sup>4</sup> Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM.

Os granulomas mais comuns em equínos são aqueles da pele causados por *Pythium*, os originados por larvas e *Habronema* sp. (habronemíase cutânea) e os produzidos pelo fungo *Basidiobolus haptosporus* e, na cavidade nasal, pelo fungo *Conidiobolus coronatus* (Miller & Campbell 1982).

O *Pythium* sp. não é um fungo. É um protista classificado como ficomiceto da família *Pythiaceae* que produz zoosporos biflagelados (Austwick & Coplan 1974, Shipton et al. 1982). Parasita de plantas aquáticas, o fungo infecta equínos no estágio de zoosporo móvel (Miller 1983b, Mendoza & Alfaro 1986), não havendo a necessidade de lesão da pele para que haja a infecção (Hutchins & Johnston 1972).

A doença ocorre em animais de regiões tropicais e subtropicais úmidas nos meses de verão, atacando equínos de todas as idades, sexos ou raças (Austwick & Copland 1974, Miller & Campbell 1982). A lesão é progressiva e ocorre nas porções baixas dos membros e na parede toracoabdominal, caracterizando-se por formações granulomatosas, fistuladas ou ulceradas com massas necróticas cinza-amareladas (Hutchins & Johnston 1972). Descrições de pitiose gastrointestinal em cães foram feitas por Miller et al. (1983) e por Miller (1985). Pitiose cutânea também já foi observada em bovinos (Miller et al. 1985).

No Rio Grande do Sul, Santos & Londero (1974), em um estudo histológico de lesões suspeitas de habronemíase cutânea, verificaram a existência de quatro casos de infecção por *Hyphomyces destruens*, dentre 10 granulomas semelhantes aos causados por *Habronema* sp. em equínos, embora, nos demais casos, não se tenha verificado histologicamente a larva da mosca.

No Mato Grosso, Carvalho et al. (1984) descreveram a ocorrência de uma dermatite nodular e ulcerativa causada por *Hyphomyces destruens* em 13 equídeos da região do pantanal.

Descrevem-se novas ocorrências de pitiose em eqüinos do Rio Grande do Sul, onde se obteve a cultura do organismo causal da doença e se fez um levantamento de todos os casos observados em 22 anos no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria.

### MATERIAL E MÉTODOS

O material deste estudo compreende espécimes de 13 biópsias e de 4 necrópsias de eqüinos, observados no período de 1965 a 1986 no Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

O material de biópsia procedeu de eqüinos de diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul e o de necropsia foi de animais da região central deste estado.

Após a fixação em formol neutro a 10%, o material para exame histológico foi clivado, incluindo em parafina e cortado a 5 micrômetros. As colorações empregadas foram a da Hematoxilina - Eosina e da impregnação pela prata (metenamina-nitrato de prata) para a evidenciação do agente etiológico da lesão.

Para a cultura foram colhidos fragmentos de material necrótico, lavados várias vezes em água destilada e semeados em agar sabouraud dextrose.

De dois animais, fragmentos do mesmo material foram triturados e clarificados com hidróxido de potássio (soda cáustica) a 10%, para exame direto.

### RESULTADOS

O maior número de animais atingidos não tinham raça definida (SDR), três eram da raça crioula e um era da raça Puro-Sangue Inglês (PSI). Animais de ambos os sexos foram atingidos igualmente e a idade variou entre oito meses e 20 anos. A evolução da doença variou de dias a meses e sua ocorrência foi, principalmente, nos meses de janeiro a março, com dois casos em maio, dois em junho e um em outubro (Quadro 1 e Fig. 1).

As lesões ocorreram nas partes inferiores dos membros posteriores em 41,2% dos casos (Fig.2); também na região esternal, na face (Fig.3), no pescoço, na vulva, no pênis, no lábio inferior.

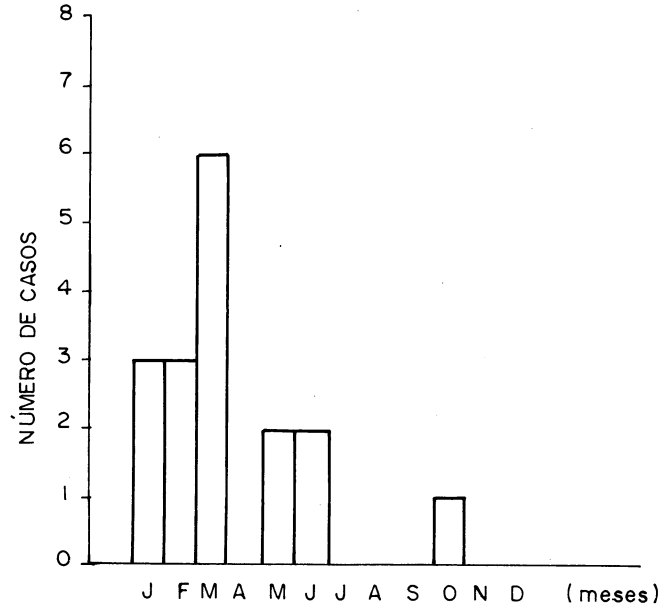


Fig. 1. Incidência da pitiose eqüina no Rio Grande do Sul, de acordo com os meses do ano.

As lesões de mama ou dos membros, eram por vezes associadas à lesão da face e do abdômen. Em apenas dois animais a lesão era no membro anterior, mas em nenhum animal necropsiado se observaram lesões em outros locais ou órgãos (Quadro 1).

Os históricos clínicos relatavam a formação de tumorações exuberantes, associadas à ulceração da pele e fistulação de onde saía material necrótico amarelado, de consistência firme (Fig.4). No material de necropsia verificou-se que essas proliferações teciduais da pele consistiam de tecido fibroso, brancacento e brilhante, entrecortado por galerias cheias de material necrótico,

Quadro 1. Pitiose eqüina no Rio Grande do Sul

Número	Raça	Sexo	Idade (anos)	Mês de ocorrência	Localização das lesões	Evolução (dias)	Tipo de material
1	SRD	M	0	Janeiro	Pescoço	...	Biópsia
2	SRD	F	15	"	Vulva	...	"
3	SRD	M	0	"	Pênis	...	"
4	SRD	M	8	Fevereiro	MPD <sup>a</sup>	20	"
5	Crioula	M	3	"	Esterno	60	"
6	SRD	M	2	"	MPE <sup>b</sup> /gengiva	120	Necropsia
7	SRD	M	10	Março	MP <sup>c</sup> /peito	...	Biópsia
8	SRD	M	5	"	MAE <sup>d</sup>	...	"
9	SRD	M	6	"	MA <sup>e</sup> /esterno	60	"
10	SRD	M	18	"	Lábio inferior	45	"
11	SRD	M	10	"	-	...	"
12	Crioula	F	6	"	Região mandibular	60	Necropsia
13	SRD	F	18	Mai	Próximo a mama	15	Biópsia
14	SRD	F	12	"	MPE	90	Necropsia
15	PSI	F	3	Junho	MP	...	Biópsia
16	Crioula	F	1	"	MPE	...	Necrópsia
17	SRD	F	2	Outubro	MP	...	Biópsia

<sup>a</sup>MPD = membro posterior direito;

<sup>b</sup>MPE = membro posterior esquerdo;

<sup>c</sup>MP = membro posterior;

<sup>d</sup>MAE = membro anterior esquerdo;

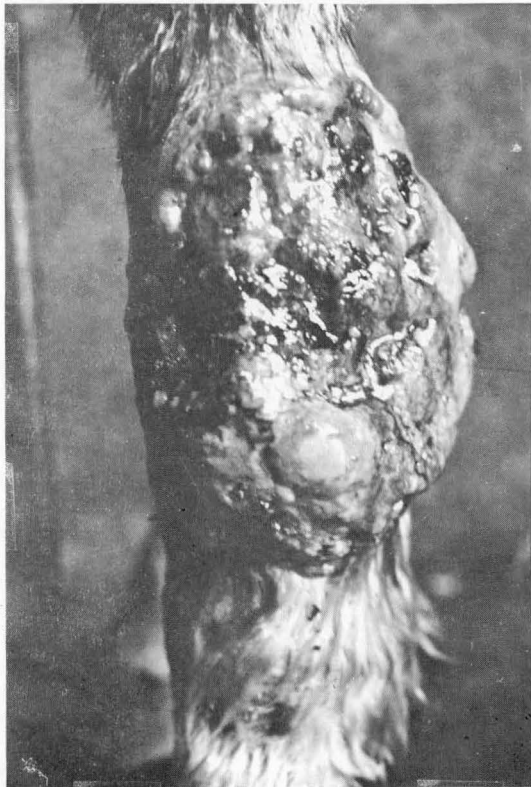
<sup>e</sup>MA = membro anterior.



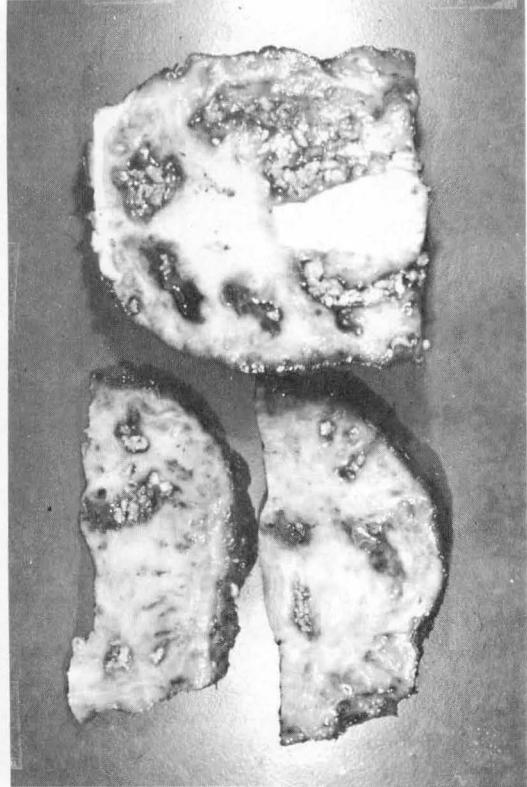
2



3



4



5

Fig. 2. Formação granulomatosa de pitiose do tecido subcutâneo da região tíbia, com inúmeros pontos salientes de fistulação, em equino de 1 ano.

Fig. 4. Grande formação granulomatosa ulcerada de pitiose de evolução de 90 dias, no metatarso com áreas de fistulação donde sai material necrótico (parte inferior), em equino de 12 anos.

Fig. 3. Tumoração ulcerada de pitiose no tecido subcutâneo da região da mandíbula com evolução de 60 dias, em equino de 6 anos.

Fig. 5. Superfície de corte do tecido de granulação na pitiose eqüina, mostrando focos de necrose de aspecto caseoso.



Fig. 6. Elementos filamentosos tubuliformes de *Pythium*, observando-se paredes paralelas e lisas com ramificações laterais, na pitiose eqüina. Metenammina-nitrato de prata. Obj. 40.

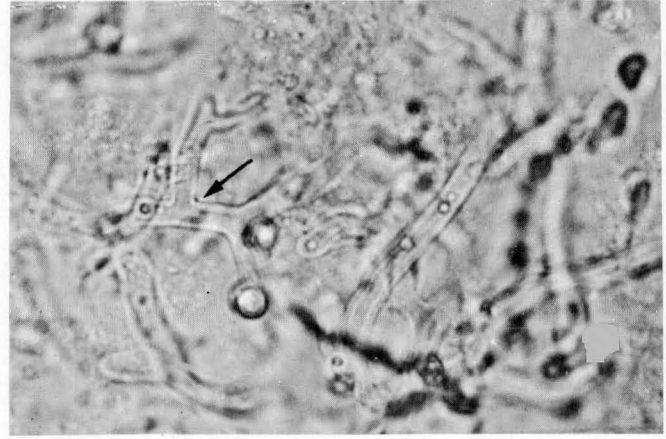


Fig. 7. Emaranhado de elementos filamentosos tubuliformes com ramificações em ângulo reto (seta) na pitiose eqüina. Exame direto do material clarificado. Obj. 40.

firme, rugoso, ramificado e amarelado que podia ser retirado facilmente do local (Fig. 5).

O aspecto histológico das lesões não variou. Os tecidos corados pela hematoxilina e eosina mostravam áreas necróticas eosinofílicas e irregulares, nas margens das quais se observavam fendas de contornos lisos, sinuosas ou não ou pequenos orifícios circulares de limites nítidos que correspondiam a cortes longitudinais ou transversais dos elementos filamentosos. Essas áreas necróticas apareciam circundadas por eosinófilos, neutrófilos e histiócitos em meio a intensa proliferação conjuntiva, às vezes, edematosa e rica em fibroblastos, outras vezes mais rica em fibras colágenas, mas sempre infiltrada por eosinófilos. Em nenhum caso se observou a invasão de vasos.

Nas impregnações pela prata os elementos filamentosos tubuliformes apareciam ramificados, de paredes lisas e paralelas com escasso material protoplasmático e algumas septações (Fig. 6). O organismo localizava-se principalmente nas margens das áreas de necrose.

Em culturas, as colônias cresceram lentamente, eram chatas, cerosas e arborecentes. Microscopicamente eram compostas por elementos filamentosos de 7 micrômetros ou mais em seus diâmetros, não septados, apresentando projeções laterais, simulando ramos arbutivos curtos.

Nas preparações para exame direto verificou-se um emaranhado de elementos de paredes lisas e paralelas com ramificações, tendendo a formar ângulos retos (Fig. 7).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A infecção por organismos do gênero *Pythium* sp. está diretamente ligada ao contacto de eqüinos com águas contaminadas, não havendo, por isso, predisposição de raça, sexo e idade. Considerando que o *Pythium* tem um ciclo evolutivo que envolve plantas aquáticas de banhados, a partir de zoóporos da água pode haver a contaminação de feridas ou então esses colonizam no pêlo dos animais e desenvolvem, mais tarde, lesões na pele danificada (Miller 1983).

Nos casos aqui apresentados todos os materiais de biópsia ou de necropsia eram de animais que viviam em áreas do estado onde existem banhados. Um dos eqüinos estava estabulado. Neste caso existe a possibilidade de contaminação do mesmo quando em contacto com água contaminada e a manifestação da doença se-

manas após, uma hipótese proposta por Miller & Campbell (1982), baseada no período de incubação do agente.

A época de maior ocorrência da doença foi nos meses quentes do ano, (janeiro a março), mas com casos nos meses frios (maio e junho) ou temperados (outubro). Observação de pitiose na Austrália e Estados Unidos também são feitas em épocas de maior calor, pois o agente requer temperatura de 30° - 40°C para a esporulação, mas o aparecimento da doença meses após o verão foi observado por Miller & Campbell (1982) em eqüinos e por Miller (1985) em caninos.

A localização das lesões nas porções baixas dos membros posteriores foi mais freqüente, seguida daquelas da região abdominal ventral e mama e da face. Curiosamente e sem explicação para o fato, os membros anteriores são menos atingidos. Essas localizações de lesões também foram observadas por Bridges & Emmons (1961) e por Miller & Campbell (1982) e as da face ocorrem quando o animal se contamina ao beber a água dos pântanos ou ao coçar as feridas dos membros. Lesões gástricas e intestinais em cães são causadas por ingestão de água contaminada (Miller 1985).

A doença tem uma evolução que varia de dias a meses e a extensão das lesões depende do tempo de evolução. São características das lesões o crescimento exuberante de tecido de granulação com fistulações de onde sai o material necrótico rico em organismos filamentosos tubuliformes, mas a lesão pode ser confundida com aquela causada por Habronema; esta, porém, regride com a chegada do frio, segundo Bridges & Emmons (1961), o que não ocorre na pitiose que leva o animal à morte por extrema debilidade.

Hutchins & Johnston (1972) obtiveram a cura de animais com pitiose através da remoção cirúrgica do processo inflamatório, associada ao uso de iodeto de potássio intravenoso. Em três animais necropsiados, deste relato, o uso desse tratamento não teve sucesso, talvez pela grande extensão das lesões. Imunoterapia foi usada com sucesso no tratamento de casos agudos da doença (Mendoza & Alfaro 1986).

A colheita do material necrótico junto do tecido de granulação é de fundamental importância para o diagnóstico histopatológico e para um diagnóstico rápido, através da digestão por hidróxido de potássio (soda cáustica) onde se observa o emaranhado de elementos filamentosos tubuliformes com ramificações em ângulo reto (Fig. 1), possibilitando assim a diferenciação da habronemíase e uma intervenção terapêutica precoce.

A grande maioria dos casos relatados eram suspeitos de habronemíase cutânea, mas o comportamento clinico-patológico idêntico de todos, comparados aqueles de onde se obteve a cultura do organismo causal ou a sua verificação pelo exame direto e a ausência de larvas de mosca em todos os casos, permitem o diagnóstico seguro de pitiose eqüina.

*Agradecimentos.*- Os autores agradecem aos Professores Dr. Alberto T. Londero e Ceci Ramos pelas culturas do organismo *Pythium* e sugestões ao trabalho.

#### REFERÊNCIAS

- Austwick P.K.C. & Copland J.W. 1974. Swamp cancer. *Nature* 250:84.
- Bridges C.H. & Emmons C.W. 1961. A phycomycosis of horses caused by *Hyphomyces destruens*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 138(11):579-589.
- Carvalho E.C.Q., Rosa C.A.R., Cruz L.C.H. & Scaff R.M. 1984. *Hyphomyces destruens*: Agente da "ferida brava" (hifomicose) em eqüídeos do pantanal de Mato Grosso. *Anais XIX Congr. Bras. Med. Vet., Cuiabá*, p. 311. (Resumo)
- Hutchins D.R. & Johnston K.G. 1972. Phycomycosis in the horse. *Aust. Vet. J.* 48:369-378.
- Mendoza L. & Alfaro A.A. 1986. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. *Mycopathologia* 94:123-129.
- Miller R.I. 1983a. Letter to the editor. Nomenclature of fungal diseases. *Vet. Pathol.* 20:251-253.
- Miller R.I. 1983b. Investigation into the biology of three "phycomycotic" agents pathogenic for horses in Australia. *Mycopathologia* 81:23-28.
- Miller R.I. 1985. Gastrointestinal phycomycosis in 63 dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186(5):473-478.
- Miller R.I. & Campbell R.S.F. 1982. Clinical observations on equine phycomycosis. *Aust. Vet. J.* 58:221-226.
- Miller R.I., Olcott B.M. & Archer M. 1985. Cutaneous pythiosis in beef calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186(9):984-986.
- Miller R.I., Qualls Jr. C.W. & Turnwald G.H. 1983. Gastrointestinal phycomycosis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182(11):1245-1246.
- Santos M.N. & Londero A.T. 1974. Zigomicose subcutânea em cavalos. *Pesq. Agropec. Bras., Série Vet.*, 9:7-8.
- Shipton W.A., Miller R.I. & Lea I.R. 1982. Cell Wall, zoospore and morphological characteristics of australian isolates of a *Pythium* causing equine phycomycosis. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 79(1):15-23.

# NÍVEIS DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES EM BOVINOS VACINADOS CONTRA RAIVA<sup>1</sup>

PAULO M. ROEHE<sup>2</sup>, AUGUSTO C. CUNHA<sup>2</sup> e ARTHUR KING<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Roehé P.M., Cunha A.C. & King A. 1987. [Neutralizing antibody levels in cattle vaccinated against rabies.] Níveis de anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados contra raiva. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(3):63-65. Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor", Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS, 90001, Brazil.

Three modified live virus vaccines and one inactivated vaccine against rabies were purchased in the market and applied into cattle, aiming the determination of neutralizing antibody levels induced. Each vaccine was injected as a single dose into groups of 10 animals/vaccine, according to manufacturer's recommendations, plus 10 uninoculated controls. Cattle serum samples were collected on days 0, 30 and 60 post-vaccination. The samples were tested against the strain CVS in the mouse neutralization test, and against CVS and ERA strains in the cell culture virus-neutralization test. All the four vaccines were shown not to be good rabies neutralizing antibody inducers. The results obtained with the two tests, despite the low titers observed in both, were not comparable, probably because of the differences in the amount of virus used for challenge.

INDEX TERMS: Rabies, neutralizing antibody, cattle.

**SINOPSE.-** Três vacinas antirábicas com vírus modificado e uma vacina inativada foram adquiridas no comércio e aplicadas em bovinos, visando a determinação dos níveis de anticorpos neutralizantes induzidos. Cada vacina foi injetada em dose única em grupos de 10 animais/vacina, de acordo com as recomendações dos fabricantes, além de 10 controles não inoculados. Amostras de soro foram coletadas nos dias 0, 30 e 60 pós-vacinação. As amostras foram testadas contra a cepa CVS no teste de vírus-neutralização em camundongos, e contra as cepas CVS e ERA no teste de vírus-neutralização em cultivos celulares. Todas as quatro vacinas demonstraram não ser boas indutoras de anticorpos neutralizantes. Os resultados obtidos com os dois testes, apesar dos baixos títulos observados em ambos, não foram comparáveis, provavelmente devido à diferença na quantidade de vírus utilizada no desafio.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Raiva, anticorpos neutralizantes, bovinos.

## INTRODUÇÃO

A raiva dos bovinos é ainda na América do Sul um problema de grandes dimensões. Anualmente, um elevado número de animais são mortos pela enfermidade, ocasionando perdas de grande significado econômico, além da perda de proteína animal (Acha 1967, Baer 1975).

Além disso, os custos sociais de cada caso são muitas vezes altos, devido à preocupação gerado por eventuais contatos com

animais enfermos e problemas relativos à necessidade ou não de tratamento de pessoas expostas.

No período 1970-1980, 41.756 casos de raiva bovina foram registrados nas Américas (Acha 1981). No Brasil, no mesmo período foram registrados 19.546 casos, aproximadamente metade do total verificado no continente. Deve-se salientar que os casos notificados seguramente representam uma sub-estimativa da real incidência (Roehé et al. 1987, no prelo).

No Rio Grande do Sul, a partir de 1983 tem se verificado uma epizootia de raiva bovina na zona serrana do Estado (Roehé et al., no prelo). Nessa ocasião, entre 1983 e 1985, foram registrados 1.410 casos da enfermidade, e até abril de 1986, já haviam sido registrados 80 novos focos (Serviço de Doenças Infecciosas, DPA - Registro de casos de raiva dos herbívoros).

Na tentativa de contribuir para o esclarecimento de fatores que possam determinar o controle da epizootia, concentramo-nos no estudo da potência de vacinas, uma vez que a vacinação é uma das alternativas de controle acessíveis aos produtores (Diego & Valotta 1979).

Nesse sentido, este trabalho foi executado visando a determinação de níveis de anticorpos neutralizantes no soro de bovinos vacinados com as vacinas antirábicas disponíveis comercialmente no Estado do Rio Grande do Sul, em determinado momento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Vacinas

Foram adquiridas no comércio quatro vacinas contra a raiva bovina, de diferentes laboratórios, com as seguintes características:

Vacina A: vacina liofilizada produzida com vírus vivo modificado, amostra ERA, em cultivo celular.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 8 de abril de 1987.

<sup>2</sup> Equipe de Virologia e Imunologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor", Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS, 90001.

<sup>3</sup> Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, Surrey, UK.

Vacina B: suspensão de tecido nervoso de bovinos neonatos (40 mg/ml) infectados com vírus fixo (CVS) inativada por betapropiolactona e adicionada de glicerina e saponina.

Vacina C: vacina liofilizada produzida com vírus vivo modificado, amostra ERA, em cultivo celular.

Vacina D: vacina liofilizada produzida com vírus vivo modificado, amostra ERA, em cultivo celular.

Todas as vacinas encontravam-se dentro dos respectivos prazos de validade, e foram mantidas à temperatura de 4<sup>o</sup>-8<sup>o</sup>C até o momento de sua aplicação, em condições idênticas.

#### Bovinos

Cinquenta bovinos sadios, não vacinados, de idade entre 1 1/2 e 3 anos foram selecionados do plantel do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" (IPVDF). Os animais foram mantidos em condições uniformes de manejo até o final dos experimentos.

Grupos de dez bovinos foram vacinados com cada uma das quatro vacinas, usando seringas e agulhas diferentes e de acordo com as instruções dos fabricantes. Um grupo de 10 animais foi mantido como controle não vacinado.

As amostras de soro foram coletadas nos dias 0, 30 e 60 após a vacinação.

#### Testes de anticorpos neutralizantes em camundongos

Os soros coletados foram testados com a técnica descrita por Atanasiu (1973), frente à cepa CVS 31/4 de vírus rábico. Resumindo, diluições de soro de 1:5 a 1:3125 foram colocadas frente a aproximadamente 20 DL<sub>50</sub> de vírus, incubadas a 37<sup>o</sup>C por 90 minutos e inoculadas em camundongos albinos suíços de 3 a 4 semanas de idade por via intra-cerebral, na dose de 0,03 ml. Os títulos foram calculados pelo método de Reed e Muench (Lorenz & Bögel 1973), e expressos como a recíproca da diluição de soro que protegeu 50% dos camundongos inoculados.

#### Testes de anticorpos neutralizantes em cultivos celulares

Os testes de avaliação de níveis de anticorpos neutralizantes foram executados no Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, Surrey, conforme a seguinte metodologia:

Células BHK-21 foram cultivadas em meio EAGLE-MEM com 10% de soro fetal bovino e 10% de caldo triptose fosfato (E.MEM). As células foram incubadas por 3 dias a 37<sup>o</sup>C. Após, as células de uma garrafa de 80 cm<sup>3</sup> foram dispersas com tripsina 0,125% e ressuspensas a uma concentração aproximada de 25.000 células/50 µl.

Os soros foram testados em duplicada frente às cepas CVS e ERA. Em placas de microtécnica de 96 orifícios, 50µl de E.MEM foram adicionados a cada poço. Vinete e quatro microlitros de cada soro foram adicionados às primeiras duas linhas e diluídos (fator de diluição 3). Após, 50µl de uma diluição de vírus CVS ou ERA contendo aproximadamente 200 doses infectantes para cultivos celulares (DICC<sub>50</sub>) foi adicionado a cada diluição e incubados a 35<sup>o</sup>C por 60 minutos. Controles de vírus (back titration), células e soros positivo e negativo, foram incluídos na prova. A seguir, 50µl da suspensão de células foi adicionada aos poços e incubada por 4 dias a 35<sup>o</sup>C.

As placas foram então fixadas em 80% acetona por 10 minutos e secas à temperatura ambiente. Após, conjugado FITC - soro anti-nucleocapsídeo de vírus rábico (Instituto Pasteur, França), foi colocado nas placas, seguido de incubação por 30 minutos. A lavagem foi feita com PBS (pH 7,2) por 10 minutos e a leitura feita em microscópio Leitz para fluorescência com lâmpada XENON 75, objetiva 25X de longo alcance e oculares 6,3X. Os orifícios foram lidos como positivos (= vírus presente) ou negativos (= vírus ausente). O cálculo dos títulos obtidos foi feito pelo método de Reed e Muench (Lorenz & Bögel 1973) e expresso como a recíproca da diluição de soro que neutralizou o vírus em 50% dos orifícios inoculados.

#### Análise estatística

Os dados obtidos com as duas técnicas foram analisados pelo teste de análise de variância (Daniel 1977).

## RESULTADOS

### Virusneutralização em camundongos frente à cepa CVS

As vacinas apresentaram aos 0, 30 e 60 dias pós-vacinação

(d.p.v.) os seguintes resultados, considerando-se a média geométrica dos títulos observados: vacina A: 0, 0,07 e 0,62, respectivamente; vacina B: 0, 0,41 e 0,40; vacina C: 0, 0,38 e 0,99; vacina D: 0, 0,33 e 0,70. Os controles não revelaram a presença de anticorpos aos 0, 30 e 60 dias.

Os títulos observados naqueles animais que reagiram positivamente variaram de 1:5 a 1:30, sendo que este último foi obtido em somente um caso, com a vacina B aos 30 d.p.v. As médias mais altas foram obtidas aos 60 d.p.v., com exceção da vacina B, que manteve média constante aos 30 e 60 d.p.v.

### Virusneutralização em cultivos celulares

Todos os animais não apresentaram anticorpos no dia zero. Aos 30 e 60 d.p.v. a vacina A apresentou médias geométricas 0,22 e 0,09 frente à cepa ERA, bem como 0,22 e 0,21 frente a cepa CVS. A vacina B: 0,08 aos 30 d.p.v. e ausência de anticorpos (<3) aos 60 d.p.v., com ambas as cepas de vírus. A vacina C: 0,25 e 0,06 frente à ERA, e 0,25 e <3 frente à CVS. A vacina D: 0,08 e <3 frente à ERA, 0,15 e 0,05 frente à CVS.

O Quadro 1 representa o número de animais com títulos de anticorpos (<1:5 ou <1:3 nos testes *in vivo* e *in vitro*, respectivamente) em proporção ao número de animais vacinados.

Quadro 1. Número de reagentes com título igual ou superior a 1:5 (nos testes de anticorpos neutralizantes em camundongos) e 1:3 (testes *in vitro*), aos 30 e 60 dias pós-vacinação

Vírus de desafio Dias pós-vacinação	Anticorpos neutralizantes					
	Em camundongos		In vitro			
	CVS		CVS	ERA		
	30	60	30	60	30	60
Vacina A	1/9 <sup>a</sup>	5/8	2/9	2/9	2/9	1/8
Vacina B	4/10	5/10	1/9	0/9	1/9	0/9
Vacina C	4/10	8/9	3/9	0/8	4/10	1/8
Vacina D	4/10	7/10	2/10	1/10	1/10	0/10
Controles	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

<sup>a</sup> x/y = número de reagentes / número de animais em teste.

Observou-se grande variabilidade nos títulos obtidos com o teste de anticorpos neutralizantes em camundongos, em comparação com os resultados em cultivos celulares. A dose de vírus de desafio utilizada no teste *in vivo* (aprox. 20 DL<sub>50</sub>) foi um logaritmo menor que a dose utilizada no teste *in vitro* (200 TCID<sub>50</sub>), o que aparentemente refletiu-se na sensibilidade das técnicas.

A análise de variância dos títulos obtidos após a utilização das quatro vacinas não revelou diferença significativa (P<0,05).

## DISCUSSÃO

Em nosso País, as vacinas antirábicas são controladas oficialmente pelo Ministério da Agricultura (Diário Oficial da União 1975), utilizando normas preconizadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO 1973).

Os testes de potência são, no entanto, métodos indiretos, isto é, não são realizados na espécie à qual as vacinas se destinam.

As vacinas destinadas a uso bovino não são testadas nessa espécie, por razões de custo e pragmaticidade. As determinações de níveis de anticorpos exigiriam um grande número de bovinos sensíveis. Além disso, se realizados testes de agressão, muitos animais teriam suas carcaças inutilizadas.

A validade da utilização de medidas de anticorpos humorais na avaliação da eficácia de vacinas antirábicas é matéria de discussão, principalmente levando-se em conta o papel da imunidade celular na proteção de indivíduos vacinados (Wiktor et al. 1977, Miller et al. 1978).

Na espécie bovina, alguns autores têm reportado que títulos altos de anticorpos estão fortemente correlacionados com proteção (Koprowski 1955, Gomez et al. 1955). Outros situam a correlação em níveis tão baixos como 1:2 (Kalmar & Tadmor 1968, Hubbard et al. 1969), 1:5 (Abelseth 1964) ou 1:10 (Ribeiro Netto et al., sem data). Ainda, alguns trabalhos não revelaram qualquer correlação (Ribeiro Netto et al. 1971, Arellano et al. 1972), o que ressalta o papel da imunidade celular no processo.

Não obstante, através deste tipo de teste têm sido estudadas várias vacinas de uso bovino, bem como são determinadas condições ótimas de dosagem, vias de aplicação e duração de imunidade (Gomez et al. 1955, Koprowski 1955, Abelseth 1964, Fábrega et al. 1965, Atanasiu et al. 1968, Fuenzalida et al. 1978).

Os resultados aqui apresentados com as quatro vacinas testadas, tanto frente à cepa CVS como à cepa ERA evidenciaram baixos níveis de anticorpos em comparação com os dados levantados por outros autores em testes similares (Atanasiu et al. 1968, Koprowski 1955, Baumgarten 1976, Dreesen et al. 1970). Embora seja impossível com os dados aqui obtidos correlacionar os títulos de anticorpos com a capacidade de induzir proteção, evidentemente a escolha da vacina mais apropriada recairia sobre a que induzisse maiores níveis de anticorpos. No presente estudo as quatro vacinas apresentaram performance similar, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos. Consequentemente, a possibilidade de escolha fica prejudicada.

Podemos, porém, afirmar com base nos resultados obtidos, que as vacinas testadas não são boas indutoras de anticorpos. Trabalhos estão em andamento para determinar a resistência de animais vacinados frente a uma agressão de vírus rábico, com cepas padrão (CVS), bem como com vírus isolado de casos de campo da presente epizootia da enfermidade.

Os dados obtidos com as técnicas *in vivo* e *in vitro* revelaram diferenças entre ambas, havendo uma maior sensibilidade em favor da primeira. Entretanto, a quantidade de vírus (CVS) de desafio utilizada nas provas apresentou uma diferença de um logaritmo, o que as tornou de difícil comparação. A quantidade maior de vírus explicaria também a maior homogeneidade dos resultados obtidos com os testes *in vitro*, bem como os títulos mais baixos e menor número de animais positivos.

Por outro lado, a variabilidade do sistema *in vivo* é bastante grande, levando a que alguns autores utilizem medianas para a expressão dos resultados (Ribeiro Netto et al. 1971, Fuenzalida et al. 1978). A correlação entre as duas técnicas em condições similares às do presente estudo foi determinada por Zalan et al. (1979). Estes autores encontraram uma significativa discrepância de 16,5% dos resultados em um total de 200 testes, apesar da correlação de 85% de sensibilidade.

Nossos dados permitem afirmar que as duas técnicas não são comparáveis quando utilizadas quantidades tão distintas de vírus na reação de soroneutralização.

## REFERÊNCIAS

- Abelseth M.K. 1964. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *Canad. Vet. J.* 5:279-286.
- Acha P.N. 1967. Epidemiology of paralytic bovine Rabies and bat Rabies. *Bull. Off. Int. Epiz.* 67:343-382.
- Acha P.N. 1981. A review of rabies prevention and control in the Americas, 1970-1980. Overall status of Rabies. *Bull. Off. Int. Epiz.* 93(1-2):9-52.
- Arellano S.C., Sureau P., Batalla C.D. & Morales J. 1972. Evaluación de la eficacia de la vacuna cepa Flury contra la rabia parálitica bovina. *Tec. Pec. en México* 19:9-14.
- Atanasiu P. 1973. Quantitative assay and potency test of antirabies serum and immunoglobulin, p. 314-418. In: M.M. Kaplan & H. Koprowski (eds), *Laboratory Techniques in Rabies*. 3<sup>o</sup> ed., cap. 40. WHO, Genebra.
- Atanasiu P., Fuenzalida E., Acha P.N. & Szyfres B. 1968. Imunidade antirábica em bovinos vacunados. *Boln Ofic. Sanit. Panam.* 64:431-440.
- Baer G.M. 1975. Bovine paralytic Rabies and Rabies in the vampire bat, p. 155-175. In: G.M. Baer (ed). *The Natural History of Rabies*, Vol. 2. Academic Press, New York.
- Baumgarten E.H. 1976. Vacuna antirábica de origen de murciélago vampiro, cepa V-319 / Acatlan para proteger el ganado bovino contra la rabia parasitante en México. *Boletín sobre Rabia Parálitica (SAG, México)*, março. 5 p.
- Daniel W. 1977. Bioestadística. Base para el analisis de las ciencias de la salud, Editorial Limusa, México.
- Diego A.J. & Valotta J.R. 1979. Rabia transmitida por murciélagos. *Boln Ofic. Sanit. Panam.* 86(6):495-508.
- Dreesen D.W., Eubanks J.F. & Behymer D.E. 1970. Antibody responses in cattle vaccinated with various rabies vaccines. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 157(6):826-830.
- Fábrega F., Fuenzalida E. & Rodríguez R. 1965. Estudio de anticuerpos neutralizantes en el suero sanguíneo de bovinos tratados con vacuna antirábica. *Zooiatría* 6:1-4.
- Fuenzalida E., Diaz A.M.O. & Rivenson S. 1978. Vacuna antirábica de cerebro de raton lactante y suplementada con adjuvante. Su aplicabilidad en bovinos. *Revta Asoc. Arg. Microb.* 10:47-53.
- Diário Oficial da União, dezembro/1975. Ministério da Agricultura, Portaria nº 881 (01/12/1975), p. 17232-17233.
- Gomez C., Black J. & Koprowski H. 1955. Rabies in cattle. III. Comparative studies on vaccination of cattle in Columbia with Flury Virus and chloroform-inactivated vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 127(10):360-363.
- Hubbard H.B., Fuenzalida E., Acha P.N., Atanasiu P., Larghi O. & Szyfres B. 1969. Rabies immunity in vaccinated cattle. *Proc. 73rd Annual Meeting of the U.S. Anim. Health Assoc.*, Oct. 12-17, p. 307-322.
- Kalmar E. & Tadmor A. 1968. Immunization of cattle against rabies with the Kelev strain vaccine. *Res. Vet. Sci.* 9:424-428.
- Koprowski H. 1955. Rabies in cattle. II. Review of immunization of herbivorous animals against rabies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 127(943):359-369.
- Lorenz R.J. & Bögel K. 1973. Methods of Calculation, p. 321-335. In: M.M. Kaplan & H. Koprowski (eds), *Laboratory Techniques in Rabies*, 3<sup>o</sup> ed., Appendix 1, WHO, Genebra.
- Miller A., Morse H.C., Winkelstein J. & Nathanson N. 1978. The role of antibody in the recovery of experimental rabies. I. Effect of depletion of B and T cells. *J. Immunol.* 121:321-326.
- Ribeiro Netto A., Nilsson M.R., Angelis Cortes J. & Miguel O. (sem data). Estudo comparativo de vacina anti-rábica de uso bovino. II. Proteção conferida pelas vacinas Alurabiffa, ERA e Formidogel. *Imunologia Veterinária, Rhodia-Mérieux, São Paulo*, 4 p.
- Ribeiro Netto A., Nilsson M.R., Miguel O., Mizuno M. & Nikitin T. 1971. Estudo comparativo de vacina anti-rábica de uso bovino. *Boln Ofic. Sanit. Panam.* 70(6):538-43.
- Roche P.M., Cunha A.C., Rodrigues R.R., Gonçalves A.R. & Ribeiro C.L.G. 1987. Diagnóstico laboratorial da Raiva no Rio Grande do Sul, Brasil: período 1979-1984. *Boln Ofic. Sanit. Panam.* (No prelo)
- Wiktor T.J., Doherty P.C. & Koprowski H. 1977. In vitro evidence of cell-mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, 74(1):334-338.
- WHO 1973. *Laboratory Techniques in Rabies*. M.M. Kaplan & H. Koprowski (eds) 3<sup>o</sup> ed., WHO, Genebra.
- Zalan E., Wilson C. & Pukitis D. 1979. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J. Biol. Standardization* 7:213-220.

# INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Vernonia mollissima* (Compositae) EM CAPRINOS<sup>1</sup>

LUIZ STOLF<sup>2</sup>, ALDO GAVA<sup>2</sup> e CARLOS HUBINGER TOKARNIA<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Stolf L., Gava A. & Tokarnia C.H. 1987. [Experimental poisoning of goats by *Vernonia mollissima* (Compositae).] Intoxicação experimental por *Vernonia mollissima* (Compositae) em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(3):67-77. Centro Agroveterinário, UDESC, Av. Luiz Camões 2090, Lages, Santa Catarina 88500, Brazil.

The aerial parts of *Vernonia mollissima*, a plant of the family Compositae, were given orally to 17 goats. An acute lethal poisoning was reproduced by the administration of single doses from 2.5 to 10 g of the plant material per kg body weight. The clinical manifestations of the poisoning were: anorexia, apathy, rumen atony, staggering gait, sternal-abdominal decubitus, hepatic sensibility, sometimes violent muscular contractions, hypothermia and death. The main post-mortem findings were observed in the liver, characterized by severe hepatic dystrophy. Histological examinations revealed massive necrosis of the liver parenchyma in the animals with a clinical course of less than 24 hours. In the animals with a longer course (about 48 hours), disappearance of the hepatic cells and congestion in the center of the lobule were observed; the midlobular and peripheral parenchymal cells were swollen and vacuolized. Additionally, there were lesions in the kidneys, which consisted of regressive changes of the epithelial cells of the uriniferous tubules; they were slight in the animals with a clinical course of less than 24 hours, pronounced in the animals with a longer course.

In the present investigation also data were obtained concerning the elevation of seric activity of alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), lactic dehydrogenase (LDH), gamma-glutamyl transferase (GGT) and alkaline phosphatase (SAP), as well as those regarding the bilirubin and protein levels.

**INDEX TERMS:** Poisonous plants, experimental plant poisoning, *Vernonia mollissima*, Compositae, goats, clinics, pathology.

**SINOPSE.-** Descreve-se em caprinos um quadro clínico-patológico de evolução aguda, letal, pela administração de *Vernonia mollissima* Don, planta pertencente à família das compostas. Esta planta mostrou-se letal para 100% dos animais que receberam 10 g/kg e para 50% dos que receberam 5 e 2,5 g/kg. A dose de 1,25 g/kg não se mostrou tóxica para a espécie caprina.

As doses únicas de 5 e 10 g/kg produziram intoxicação com evolução clínica inferior a 24 horas, enquanto com 2,5 g/kg a evolução foi superior a este período (de aprox. 48 horas).

O quadro clínico caracterizou-se por anorexia, prostração, sensibilidade hepática, atonia de rúmen, emissão constante de berros e gemidos, decúbito esterno-abdominal e lateral, movimentos de pedalagem, às vezes contrações musculares violentas, hipotermia, estado de coma e morte.

As principais lesões macroscópicas foram observadas a nível hepático, caracterizando uma grave distrofia hepática. Microscopicamente observou-se difusa necrose de coagulação no parên-

quima hepático, nos animais em que a evolução foi inferior a 24 horas, e desaparecimento das células centrolobulares e congestão centrolobular, além de tumefação e vacuolização dos hepatócitos nas zonas intermediária e periférica, nos casos de evolução mais prolongada. A nível renal observaram-se, na maioria dos animais, processos regressivos nas células epiteliais dos túbulos uriníferos, leves nos casos com evolução inferior a 24 horas e acentuados nos casos com evolução mais longa.

O comportamento sérico das enzimas aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), gama glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (SAP) foi de aumento progressivo e constante até o óbito. As bilirrubinas apresentaram níveis séricos variáveis individualmente e com o tempo de evolução clínica. O quociente GGT/AST foi inversamente proporcional ao grau de necrose hepática; o quociente AST/ALT foi diretamente proporcional ao grau de necrose hepática, atingindo índices elevados.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Plantas tóxicas, intoxicação experimental por planta, *Vernonia mollissima*, Compositae, caprinos, clínica, patologia.

## INTRODUÇÃO

O rebanho caprino no Brasil em 1981, segundo o Departamento de Estatística Agropecuária do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, era de 8.865.000 animais, distribuídos de forma ir-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 22 de abril de 1987.

Parte da tese de Mestrado do primeiro autor, realizada na Unidade de apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal, Embrapa, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851.

<sup>2</sup> Centro Agroveterinário, UDESC, Av. Luiz Camões 2090, Lages, Santa Catarina, 88500.

<sup>3</sup> Depto Nutrição Animal, Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, RJ.

regular pelo território nacional, tendo sua maior concentração no Nordeste (Fundação IBGE 1983). Em função de sua capacidade de aproveitamento e conversão alimentar e de sua rusticidade e produtividade, bem como da excelente fonte de leite e carne que representa, especialmente para suprir carências alimentares das famílias de baixo poder aquisitivo, a criação dessa espécie tem merecido grande incentivo, especialmente no Sul do país, onde vem ocorrendo, além do crescimento populacional, considerável desenvolvimento zootécnico.

O estudo das plantas tóxicas para animais domésticos tem merecido especial atenção dos pesquisadores brasileiros, geralmente em função das vultosas perdas econômicas decorrentes das mortes ou quedas de produção que essas plantas determinam, principalmente nas estações secas ou frias, quando a escassez de alimentos induz os animais a modificarem os seus hábitos alimentares sob influência poderosa do fator "fome".

Experimentos nesse sentido foram conduzidos em bovinos com muitas plantas; no entanto, não se pode simplesmente transferir os dados clínico-patológicos de bovinos para outras espécies animais, sem o risco de se cometer graves erros. As plantas tóxicas de interesse agropecuário, que podem ser definidas como sendo "aquelas que, quando ingeridas pelo animal em condições naturais, causam danos à sua saúde ou mesmo a morte", foram pouco estudadas em caprinos no Brasil, e a maioria dos trabalhos foi realizada no Nordeste, onde essa espécie apresenta maior interesse econômico.

Ao estudar as plantas tóxicas para caprinos, dois caminhos podem ser seguidos simultaneamente: 1) tentar esclarecer mortes em caprinos possivelmente causadas por plantas tóxicas; 2) verificar se plantas comprovadamente tóxicas para bovinos e ovinos o seriam também para caprinos.

Uma das plantas comprovadamente tóxica para bovinos e ovinos é o sub-arbusto *Vernonia mollissima* Don, pertencente à família Compositae, estudada por Döbereiner et al. (1976) e Gava (1986), e responsável por mortandades em bovinos e provavelmente ovinos nos municípios de Bela Vista, Ponta Porã e Caracol, Mato Grosso do Sul. A sua toxidez foi demonstrada também para coelhos (Tokarnia et al. 1986).

*Vernonia mollissima* distribui-se, segundo Coelho (1985), pelos Estados de Mato Grosso do Sul, nos municípios de Ponta Porã, Bela Vista e Caracol, do Rio Grande do Sul, nos municípios de Cruz Alta e Tupanciretã, e do Paraná, em área não delimitada, e também na Argentina. Temos encontrado a planta também no município de Júlio de Castilhos, Rio Grande do Sul.

Os objetivos do presente estudo foram: 1) verificar se caprinos seriam sensíveis à intoxicação por *V. mollissima*, à semelhança de outras espécies de ruminantes; 2) avaliar o quadro clínico e anátomo-histopatológico nessa espécie e 3) estabelecer padrões de variação sero-enzimática e sua correlação com as lesões hepáticas em amostras de soro coletadas em diferentes épocas da evolução do quadro clínico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Partes aéreas de *Vernonia mollissima* Don foram coletadas na Fazenda Margarida, internada Vahy, município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul, no início do mês de setembro de 1985. Os brotos, medindo de 3 a 10 cm de altura (Fig. 1 e 2), foram colhidos aproximadamente 15 dias após as queimadas dos campos e dessecados à sombra e em temperatura ambiente. Duas amostras da brotação fresca foram pesadas e dessecadas em separado para controle da perda de peso. O período de secagem foi de aproximadamente 16 dias, findos os quais fez-se nova pesagem das amostras, constatando-se perda de 80% de seu peso em relação à brotação verde.

O trabalho foi conduzido nas dependências da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Setor de Patologia Animal, no município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. Foram utilizados 17 caprinos, sem raça definida, de ambos os sexos, com idade variável de 1 a 2 anos, pesando de 10 a 40 kg. Todos os animais foram desverminados com albendazole<sup>4</sup> a 1%, na dose de 2 ml para cada 10 kg de peso corporal, por via oral, e mantidos em baias de alvenaria, com água e capim à vontade.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos. Um grupo de cinco animais recebeu 10 g/kg de peso corporal. Os caprinos dos outros grupos, com quatro animais cada um, receberam 5, 2,5 e 1,25 g/kg de peso corporal. A planta dessecada foi administrada em sua forma integral, por via oral e em dose única<sup>5</sup>.

Os exames clínicos de rotina foram efetuados três vezes ao dia a partir do dia da administração até ao do óbito ou até os animais serem considerados livres da possibilidade de ainda adoecerem. Nesses exames foram avaliados os seguintes parâmetros: temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória, motilidade ruminal, sensibilidade hepática à palpação, apetite, dipisia, aspecto das fezes, atitudes, posição e comportamento. Os dados obtidos foram registrados em fichas individualizadas, assim como foram cronometrados os tempos das ocorrências.

As colheitas de amostras sanguíneas foram efetuadas, uma antes da administração da planta e as demais 6, 12, 18, 24, 30, 42, 54 e 78 horas após. Nos caprinos 4762 e 4764, por terem apresentado evolução mais longa que os demais casos letais, foram efetuadas mais quatro colheitas, a 102, 108, 114 e 120 horas após a administração da planta. Após a retração do coágulo, o soro foi separado, centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos, identificado e mantido em congelação a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

A quantificação bioquímica foi efetuada na Seção de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Naval Marcílio Dias, na cidade do Rio de Janeiro. A fosfatase alcalina foi determinada pelo teste cinético otimizado (Merckotest)<sup>6</sup>, a gama-glutamil transferase pelo teste cinético (Merck-1-test)<sup>6</sup>, a aspartato amino transferase, a alanina amino transferase e a lactato desidrogenase pelo teste UV<sup>7</sup> otimizado respectivo a cada enzima (Merckotest)<sup>6</sup>. As bilirrubinas foram determinadas pelo método Jendrasik e Grof Schellong e Wende (Merckotest)<sup>6</sup>.

As proteínas totais e as albuminas foram determinadas pelo método biureto verde de bromocresol (Merckotest)<sup>6</sup>.

Os animais que morreram foram imediatamente necropsiados e fragmentos de órgãos viscerais e sistema nervoso central foram coletados e conservados em formol a 10% para estudos histológicos. Fragmentos desses órgãos foram incluídos em parafina, cortados em secção de 6  $\mu\text{m}$  e corados em hematoxilina-eosina. Fragmentos de fígado e rins foram adicionalmente cortados por congelação e corados com Sudan III (Pallasko & Schmidel 1959).

Os valores dos constituintes séricos dos animais que desenvolveram um quadro de intoxicação experimental por *Vernonia mollissima* foram submetidos à análise de variância e ao teste de Duncan.

## RESULTADOS

Os principais dados dos experimentos em caprinos com *Vernonia mollissima* estão expostos no Quadro 1.

Todos os animais que receberam 10 g de *Vernonia mollissima* por quilograma de peso corporal (4751, 4754, 4755, 4758 e 4759) adoeceram e morreram. Os primeiros sintomas surgiram de 15 horas e 1 minuto a 23 horas e 44 minutos após a administração da planta. A evolução do quadro clínico durou de 6 horas e 58 minutos a 22 horas e 37 minutos. O óbito verificou-se de 24 horas e 58 minutos a 46 horas e 21 minutos após a administração da planta.

Dos caprinos que receberam 5 g/kg de peso corporal, dois adoeceram e morreram (4753 e 4760); o primeiro apresentou os

4 Valbazen a 1%.

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

6 QUIMITRA Comércio e Indústria Química S.A. - Merck, Estrada dos Bandeirantes 1099, Rio de Janeiro, RJ.

7 Ultra violeta.

Quadro 1. *Evolução clínica de caprinos intoxicados experimentalmente por Vernonia mollissima em dose única*

Número do caprino	Peso (kg)	Dose administrada (g/kg)	Total de planta seca adm. (g)	Total de planta fresca correspondente (g)	Início dos sintomas após adm.	Duração da evolução	Óbito após a administração
4751	13,0	10,0	26,00	130,00	18 h 00 min	6 h 58 min	24 h 58 min
4754	18,0	10,0	36,00	180,00	15 h 01 min	18 h 34 min	33 h 35 min
4755	31,0	10,0	62,00	310,00	18 h 10 min	16 h 20 min	34 h 30 min
4758	40,0	10,0	80,00	400,00	23 h 44 min	22 h 37 min	46 h 21 min
4759	14,0	10,0	28,00	140,00	17 h 00 min	13 h 45 min	30 h 45 min
4753	16,0	5,0	16,00	80,00	22 h 38 min	14 h 10 min	36 h 48 min
4760	12,5	5,00	12,50	62,50	14 h 50 min	6 h 05 min	20 h 55 min
4752	16,5	5,00	16,50	82,50	42 h 00 min	6 h 00 min	Recuperou-se
4757	29,0	5,00	29,00	145,00	Não adoeceu	-	-
4761	12,0	2,50	6,00	30,00	Não adoeceu	-	-
4762	13,0	2,50	6,50	32,50	76 h 00 min	48 h 39 min	124 h 39 min
4763	10,0	2,50	5,00	25,00	Não adoeceu	-	-
4764	13,0	2,50	6,50	32,50	67 h 50 min	55 h 30 min	122 h 20 min
4756	19,0	1,25	4,75	23,75	Não adoeceu	-	-
4768	10,5	1,25	2,70	13,50	Não adoeceu	-	-
4769	13,0	1,25	3,30	16,50	Não adoeceu	-	-
4770	13,0	1,25	3,30	16,50	Não adoeceu	-	-

primeiros sintomas 22 horas e 38 minutos após a administração da planta, com evolução de 14 horas e 10 minutos. O segundo adoeceu 14 horas e 50 minutos após a administração e teve evolução de 6 horas e 5 minutos. O terceiro animal (4752) adoeceu levemente, demonstrando apenas prostração, anorexia e atonia de rúmen com fracos bracejos. No quarto animal (4757) não foram observadas alterações nos parâmetros clínicos estudados.

Dos animais do grupo que recebeu 2,5 g/kg, dois (4762 e 4764) adoeceram e morreram. Esses animais demonstraram os primeiros sintomas 76 horas e 67 horas e 50 minutos após a administração e tiveram evolução de 48 horas e 39 minutos e 55 horas e 30 minutos, respectivamente. Os outros dois caprinos (4761 e 4763) não adoeceram clinicamente.

Os caprinos que receberam 1,25 g/kg não apresentaram alterações clínicas, mantendo os parâmetros estudados em faixas normais durante todo o período do experimento.

O quadro clínico observado nos animais que desenvolveram intoxicação aguda por *V. mollissima* foi manifestado inicialmente por abatimento, prostração, anorexia, estação em pé com o dorso arqueado, pelos arrepiados e moderada sensibilidade à palpação.

Em seguida, a prostração tornava-se mais profunda, os animais mantinham a cabeça baixa, as orelhas caídas, o olhar fixo, os membros posteriores em abdução, apoiando-se nas paredes para manter o equilíbrio, e o andar era cambaleante quando os animais eram tocados, além de manifestarem constantemente berros. Nessa fase verificou-se, em todos os animais, atonia de rúmen, timpanismo moderado e manifesta sensibilidade hepática à palpação.

Na fase final, caracterizada por temperatura retal em declínio, os caprinos assumiam inicialmente decúbito esterno-abdominal e depois lateral. A emissão de gemidos e berros continuava constante, além de violentas contrações musculares, intercaladas por movimentos de pedalagem, mais manifestos nos membros posteriores, e em alguns casos contrações abdominais expressando um quadro doloroso. Alguns animais apresentavam torcicolo e outros o pescoço ladeado para o costado esquerdo ou direito quando em

decúbito esterno-abdominal (Fig. 3). Precedendo o óbito, todos os animais apresentaram redução da frequência respiratória e respiração ruidosa, além de ausência de reflexos e da sensibilidade cutânea e corneal, caracterizando um quadro comatoso de curta duração. O caprino 4762 foi o único que desenvolveu icterícia.

A necropsia evidenciou lesões, principalmente a nível hepático (Fig. 4), observadas tanto na superfície quanto ao corte. Fígado com aspecto de noz-moscada e nítido desenho lobular, com ponto vermelho-escuro no centro e de periferia acinzentada, foi observado em quatro animais (4754, 4755, 4758 e 4762). No fígado do caprino 4751, o aspecto de noz-moscada foi de apresentação leve assim como o desenho lobular. O caprino 4753 apresentou o fígado ligeiramente descorado com pequeno número de pontos avermelhados de distribuição uniforme. O fígado do caprino 4760 apresentou-se com coloração acinzentada, com leve nitidez lobular com centro cinza e periferia avermelhada, enquanto coloração amarelada com pequenos pontos e finas estrias avermelhadas com leve nitidez lobular foi observada no fígado do caprino 4764. No caprino 4759, o fígado apresentou-se com pontilhado vermelho-escuro além de múltiplas áreas com a mesma coloração, de diâmetro variável entre 0,1 a 0,5 cm e com aspecto nodular à palpação. Todos os animais manifestaram edema de parede da vesícula biliar, exceto o caprino 4764, e em três deles (4754, 4755 e 4762) o edema foi extensivo ao mesentério. Seis animais (4751, 4755, 4758, 4753, 4760 e 4764) desenvolveram flacidez cardíaca com dilatação das cavidades em grau variável. Edema de pelve renal foi observado em três animais (4762, 4754 e 4753). O caprino 4762 apresentou áreas avermelhadas tipo sufusões sub-epicárdicas, mais evidentes no sulco coronário. Em dois caprinos (4760 e 4759) foi observado moderado ressecamento do conteúdo do colo e do reto e no caprino 4758, esse ressecamento era mais marcado. O caprino 4762 apresentou icterícia perceptível principalmente nas mucosas e nas gorduras cardíaca e perirrenal.

As principais lesões histológicas foram observadas a nível he-

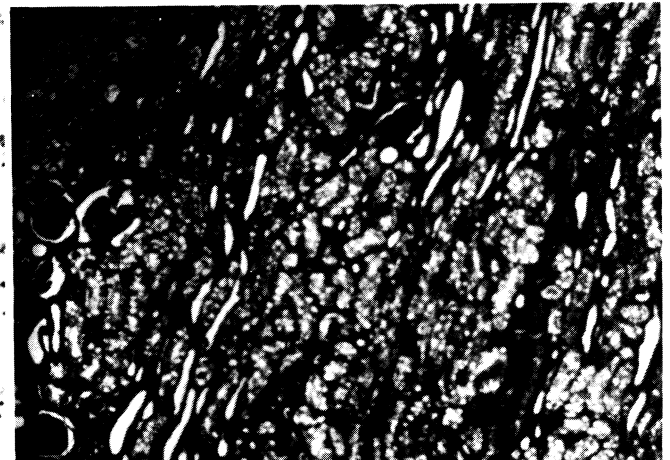
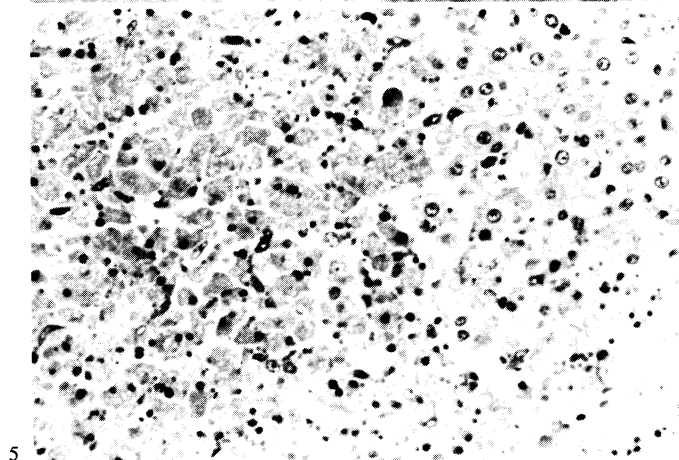
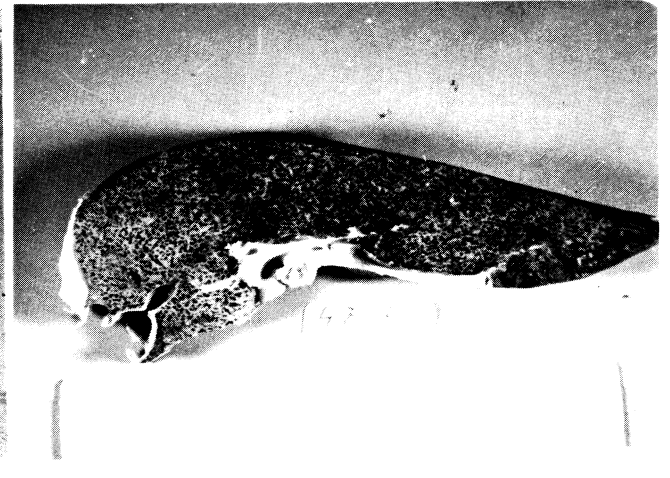


Fig. 1. *Vernonia mollissima*, em uma invernada da Fazenda Margarida, município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul, aproximadamente 20 dias após a queimada.

Fig. 3. Caprino 4758 em decúbito esterno-abdominal e com torcicolo. Intoxicação experimental por *Vernonia mollissima*, 10 g/kg.

Fig. 5. Necrose maciça do parênquima hepático, na intoxicação experimental por *V. mollissima*, no caprino 4758 cuja evolução clínica foi inferior a 24 horas.

Fig. 2. *Vernonia mollissima* em maior aproximação.

Fig. 4. Fígado com aspecto de noz-moscada na intoxicação experimental aguda por *V. mollissima*, 10 g/kg (Caprino 4758).

Fig. 6. Vacuolização e picnose das células epiteliais dos túbulos uriníferos na intoxicação experimental aguda por *V. mollissima*, 2,5 g/kg (Caprino 4762).

pático e renal. No fígado de todos os animais que morreram *antes das 48 horas* após a administração da planta observou-se necrose de coagulação, afetando todas as células, as quais apresentavam seus núcleos em picnose ou cariorréxia ou então sem núcleo e o

citoplasma estava mais eosinófilo (Fig. 5). Houve congestão de intensidade moderada a marcada com distribuição irregular, predominantemente nas zonas centrolobular e intermediária. Nos caprinos 4755 e 4759 observou-se fina vacuolização das células

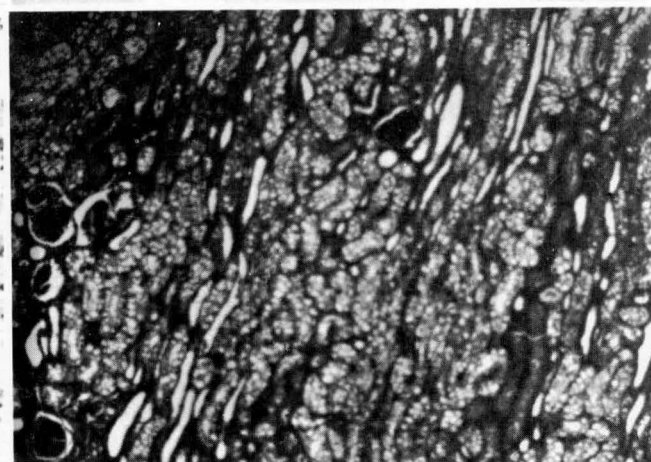
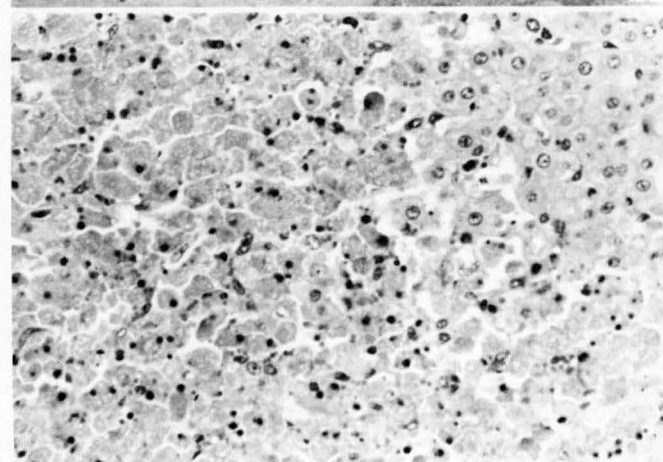
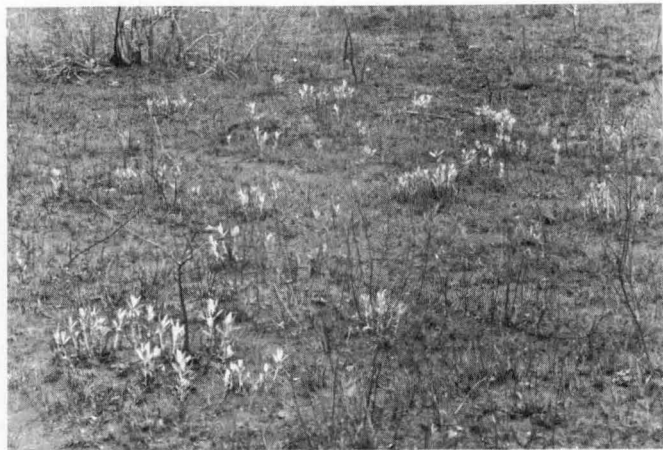


Fig. 1. *Vernonia mollissima*, em uma invernada da Fazenda Margarida, município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul, aproximadamente 20 dias após a queimada.

Fig. 3. Caprino 4758 em decúbito esterno-abdominal e com torcicolo. Intoxicação experimental por *Vernonia mollissima*, 10 g/kg.

Fig. 5. Necrose maciça do parênquima hepático, na intoxicação experimental por *V. mollissima*, no caprino 4758 cuja evolução clínica foi inferior a 24 horas.

Fig. 2. *Vernonia mollissima* em maior aproximação.

Fig. 4. Fígado com aspecto de noz-moscada na intoxicação experimental aguda por *V. mollissima*, 10 g/kg (Caprino 4758).

Fig. 6. Vacuolização e picnose das células epiteliais dos túbulos uriníferos na intoxicação experimental aguda por *V. mollissima*, 2,5 g/kg (Caprino 4762).

pático e renal. No fígado de todos os animais que morreram antes das 48 horas após a administração da planta observou-se necrose de coagulação, afetando todas as células, as quais apresentavam seus núcleos em picnose ou cariorrexis ou então sem núcleo e o

citoplasma estava mais eosinófilo (Fig. 5). Houve congestão de intensidade moderada a marcada com distribuição irregular, predominantemente nas zonas centrolobular e intermediária. Nos caprinos 4755 e 4759 observou-se fina vacuolização das células

hepáticas necrosadas da zona periférica e intermediária, e no caprino 4758, em células não necrosadas da periferia do lóbulo (Sudan III positivo para gordura). Houve também uma discreta proliferação das vias biliares em todos os animais que morreram.

Observou-se, nos rins desses animais, degeneração albuminosa vacuolar das células epiteliais dos túbulos uriníferos, de distribuição difusa na cortical, e de grau discreto a leve, e em um caprino (4755), moderado. Degeneração gordurosa de intensidade moderada foi observada nas células epiteliais do túbulos uriníferos do caprino 4758. Na luz tubular observou-se material eosinófilo em forma de esferas.

Por outro lado, o estudo histológico dos caprinos 4762 e 4764, os quais morreram aproximadamente 120 horas após a administração da planta, revelou a nível hepático, congestão com desaparecimento das células hepáticas centrolobulares, tumefação, vacuolização acentuada, condensação da cromatina ou ausência de núcleos dos hepatócitos mediazonais, enquanto na zona periférica se observou tumefação e fina vacuolização, o que lhe conferiu um aspecto espumoso (Sudan III positivo para gordura). Nesses dois animais observou-se, na cortical e na junção córtico-medular renal, marcada degeneração vacuolar (Sudan III positivo para gordura) com lise da grande maioria das células epiteliais dos túbulos uriníferos e estas com seus núcleos em picnose ou ausentes (Fig. 6).

Além dessas lesões, observou-se moderada congestão esplênica nos caprinos 4754, 4759, 4760, 4762 e 4764.

A atividade sérica da alanina amino transferase (ALT) nos caprinos desse experimento, em coletas efetuadas antes da administração da planta, variou de 8 a 16 UI/1, com média de 12 UI/1 (Quadro 2). O início da elevação da atividade sérica dessa enzima nos animais que morreram foi observado entre 18 a 24 horas após a administração, exceto para os caprinos 4762 e 4764, nos quais o início da elevação da atividade se verificou a 30 horas da administração. Todos os animais demonstraram uma elevação progressiva até o óbito. No caprino 4752, o único que adoeceu e se recuperou, a maior atividade foi coincidente com a apresentação de sintomas.

A atividade sérica da aspartato amino transferase (AST), em coletas efetuadas antes da administração da planta, variou de 33 a 74 UI/1, com média de 47,3 UI/1 (Quadro 3). O início da elevação da atividade dessa enzima foi observado entre 12 a 30 horas da administração da planta e essa elevação foi progressiva até o óbito em todos os animais, exceto para o caprino 4762 que apresentou pequenas oscilações nas últimas coletas, com os valores já elevados. Nos caprinos 4761 e 4763, nos quais não foram observadas alterações clínicas, a atividade dessa enzima apresentou-se elevada no período de 24 a 78 horas após a administração da planta. No caprino 4752, o qual adoeceu e se recuperou, a maior atividade dessa enzima foi coincidente com a apresentação dos sintomas.

A enzima lactato desidrogenase (LDH) apresentou atividade sérica variando de 230 a 408 UI/1, com média de 310,82 UI/1, nas amostras coletadas antes da administração da planta (Quadro 4). O início da maior atividade sérica foi observado nas amostras coletadas entre 12 a 24 horas após a administração e essa atividade elevou-se progressivamente até o óbito em todos os animais, exceto para o caprino 4762, no qual ocorreram oscilações na fase final, mantendo os valores elevados. No caprino 4752, o qual adoeceu e se recuperou, a atividade dessa enzima apresentou o pique máximo coincidente com a presença de sintomas. Nos caprinos 4761 e 4763, os quais não apresentaram sintomas, a atividade dessa enzima esteve elevada nas amostras coletadas entre 42 a 78 horas após a administração da planta.

A gama-glutamil transferase (GGT) apresentou atividade sérica de 11 a 40 UI/1, com média de 20,9 UI/1, nas amostras coletadas antes da administração da planta, e demonstrou elevação progressiva dessa atividade até o óbito, exceto nas amostras colhidas do caprino 4762, o qual apresentou uma pequena oscilação (Quadro 5). O início da elevação da atividade sérica foi observado nas amostras colhidas entre 12 a 24 horas após a administração da planta. No caprino 4752, o qual adoeceu e se recuperou, o pique máximo da atividade dessa enzima foi coincidente com a apresentação de sintomas. Nos caprinos 4761 e 4763, os quais não apresentaram alterações clínicas, foi observada moderada

Quadro 2. Variação da atividade sérica da enzima alanina amino transferase (ALT) em caprinos submetidos a intoxicação experimental aguda por *Vernonia mollissima*

Número do caprino	Valores da atividade sérica nos diversos tempos após a administração da planta (UI/ml)												
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	42 h	54 h	78 h	102 h	108 h	114 h	120 h
4751	10	12	11	33	51 <sup>+</sup> a								
4754	13	14	14	20	27	35	47 <sup>+</sup>						
4755	10	10	13	16	28	41	52 <sup>+</sup>						
4758	8	10	8	9	17	50	96 <sup>h</sup>	127 <sup>h+</sup>					
4759	12	14	14	27	42	91	97 <sup>+</sup>						
4753	15	14	15	17	24	38	41 <sup>+</sup>						
4760	9	10	9	15	20 <sup>h+</sup>								
4752	16	18	17	17	19	22	42	29	22 <sup>-</sup>				
4757	12	15	13	13	13	12	13	12	13				
4761	11	11	11	12	11	12	13	16	13				
4762	11	12	10	10	13	23	28	39	32	30	30	29	39 <sup>+</sup>
4763	14	14	15	13	14	14	18	17	14				
4764	14	14	15	14	15	18	25	16	30	30	32	32	30
4756	16	15	18	29	16	14	15	15	18				
4768	10	12	12	13	12	12	15	13	17				
4769	15	16	14	17	14	16	17	19 <sup>h</sup>	21 <sup>h</sup>				
4770	8	9	10	12	10	10	9	9	10				

<sup>a</sup> + = óbito, - = somente adoeceu, h = hemólise.

Quadro 3. *Varição da atividade sérica da enzima aspartato amino transferase (AST) em caprinos submetidos a intoxicação experimental aguda por Vernonia mollissima*

Número do caprino	Valores da atividade sérica nos diversos tempos após a administração da planta (UI/ml)													
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	42 h	54 h	78 h	102 h	108 h	114 h	120 h	
4751	42	45	50	320	770 <sup>+</sup> a									
4754	44	44	41	116	236	370	390 <sup>+</sup>							
4755	43	46	129	322	760	1520	1610 <sup>+</sup>							
4758	41	41	39	55	259	1050	2450 <sup>h</sup>	2220 <sup>h</sup>						
4759	49	48	51	220	420	940	1100 <sup>+</sup>							
4753	55	53	171	290	550	610 <sup>+</sup>								
4760	37	35	31	250	327 <sup>h+</sup>									
4752	53	59	58	58	81	114	300	220	161 <sup>-</sup>					
4757	74	78	72	80	80	74	77	65	68					
4761	51	45	42	42	44	59	130	194	140					
4762	59	50	49	49	181	362	460	680	650	550	400	430	520 <sup>+</sup>	
4763	50	54	52	51	77	129	307	307	313					
4764	36	40	39	40	40	59	210	257	510	730	860	880	885 <sup>+</sup>	
4756	49	48	67	51	49	50	48	49	50					
4768	40	39	39	41	39	43	75	70	82					
4769	49	52	47	51	50	52	76	173 <sup>h</sup>	285 <sup>h</sup>					
4770	33	38	33	44	37	42	38	38	43					

<sup>a</sup> + = óbito, - = somente adoeceu, h = hemólise.

elevação, nas amostras colhidas a partir das 30 horas após a administração e que se manteve até a última coleta (78 horas).

A atividade sérica da fosfatase alcalina (SAP), nas amostras coletadas antes da administração da planta, apresentou ampla variação, oscilando de 34 a 270 UI/l, com média de 109,2 UI/l (Quadro 6). Todos os animais que desenvolveram intoxicação por *Vernonia mollissima* com êxito letal apresentaram considerável elevação na atividade sérica dessa enzima nas amostras colhidas a partir de 18 ou 24 horas após a administração da planta e essa elevação foi progressiva até o óbito.

O quociente GGT/AST, quando obtido das amostras colhidas antes da administração da planta, variou de 0,30 a 0,63, com mé-

dia de 0,45. Esse índice, nas amostras colhidas após o início da sintomatologia, variou de 0,07 a 0,23, com média de 0,15, enquanto nas amostras colhidas com os animais em estado de coma esse índice variou de 0,05 a 0,20, com média de 0,10. (Quadro 7)

O quociente enzimático AST/ALT (DE RITES), quando obtido das amostras colhidas antes da administração da planta, variou de 2,60 a 5,30, com média de 4,02. Nas amostras colhidas nos animais após o início dos sintomas, esse índice variou de 8,70 a 27,10, com média de 15,70, enquanto nas amostras colhidas com os animais em estado de coma o índice variou de 8,29 a 30,90, com média de 17,45. (Quadro 7)

Os valores das bilirrubinas nos caprinos desse experimento,

Quadro 4. *Varição da atividade sérica da enzima lactato desidrogenase (LDH) em caprinos submetidos a intoxicação experimental aguda por Vernonia mollissima*

Número do caprino	Valores da atividade sérica nos diversos tempos após a administração da planta (UI/ml)													
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	42 h	54 h	78 h	102 h	108 h	114 h	120 h	
4751	307	313	307	686	1025 <sup>+</sup> a									
4754	281	314	259	332	568	729	836 <sup>+</sup>							
4755	390	387	469	596	1050	1520	2030 <sup>+</sup>							
4758	372	374	337	346	618	1280	2700 <sup>h</sup>	3220 <sup>h+</sup>						
4759	236	312	314	538	1195	2740	2620 <sup>+</sup>							
4753	350	344	316	459	583	890	897 <sup>+</sup>							
4760	240	279	269	569	858 <sup>h+</sup>									
4752	327	361	348	355	451	601	1070	1480	1050 <sup>-</sup>					
4757	308	373	366	316	356	318	299	285	306					
4761	230	270	221	233	239	245	484	950	687					
4762	317	269	243	263	412	675	850	1470	2020	2430	1820	1435	1855 <sup>+</sup>	
4763	273	274	272	270	309	352	771	820	653					
4764	303	310	291	336	401	492	620	1580	1640	1660	1780	1820	1840 <sup>+</sup>	
4756	408	403	493	368	368	366	334	353	418					
4768	336	389	352	400	359	372	365	360	380					
4759	347	298	318	369	319	348	396	891 <sup>h</sup>	1390 <sup>h</sup>					
4770	259	259	252	260	262	285	263	296	284					

<sup>a</sup> + = óbito, - = somente adoeceu, h = hemólise.

Quadro 5. *Varição da atividade sérica da enzima gama-glutamil transferase (GGT) em caprinos submetidos a intoxicação experimental aguda por Vernonia mollissima*

Número do caprino	Valores da atividade sérica nos diversos tempos após a administração da planta (UI/ml)													
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	42 h	54 h	78 h	102 h	108 h	114 h	120 h	
4751	17	16	17	54	57 <sup>+</sup> a									
4754	20	21	19	42	55	57	57 <sup>+</sup>							
4755	27	27	63	88	105	94	100 <sup>+</sup>							
4758	24	24	23	27	56	73	87 <sup>h</sup>	100 <sup>h+</sup>						
4759	16	16	17	41	53	52	53 <sup>+</sup>							
4753	26	27	26	52	57	61	62 <sup>+</sup>							
4760	11	12	12	48	67 <sup>h+</sup>									
4752	21	22	22	22	28	41	52	54	50 <sup>-</sup>					
4757	21	21	21	21	20	20	21	19	20					
4761	14	14	14	13	14	17	26	28	28					
4762	18	16	16	16	29	38	44	62	75	63	56	56	48 <sup>+</sup>	
4763	40	39	40	41	45	52	67	75	67					
4764	20	21	20	18	19	24	64	89	131	127	128	138	136 <sup>+</sup>	
4756	25	25	28	24	22	22	21	21	22					
4768	22	22	23	21	21	21	26	31	34					
4769	15	15	15	14	15	14	16	20 <sup>h</sup>	25 <sup>h</sup>					
4770	18	19	17	17	17	17	17	16	16					

<sup>a</sup> + = óbito, - = somente adoeceu, h = hemólise.

em amostras colhidas antes da administração da planta, variaram de 0,41 a 0,82 mg/100 ml, com média de 0,56 mg/100 ml para a bilirrubina total (BT), de 0,21 a 0,41 mg/100 ml, com média de 0,28 mg/100 ml para a bilirrubina direta (BD) e de 0,20 a 0,41 mg/100 ml, com média de 0,28 mg/100 ml (Quadro 8) para a bilirrubina indireta (BI). O caprino 4762, o único que desenvolveu a síndrome icterica, apresentou hiperbilirrubinemia com os seguintes valores, na amostra coletada 120 horas após a administração da planta: BT, 3,08, BD, 2,26 (73,4%) e BI, 0,82 (26,6%) mg/100 ml; o início da elevação das bilirrubinas foi

observado a partir da amostra coletada 42 horas após a administração da planta, antes do aparecimento de sinais clínicos. O caprino 4759 apresentou hiperbilirrubinemia com os seguintes valores, na amostra coletada 42 horas após a administração da planta, em estado de coma: BT, 2,86, BD, 1,33 (46,5%) e BI, 1,53 (53,5%) mg/100 ml. O início da hiperbilirrubinemia, neste caso, foi observado a partir da amostra coletada 18 horas após a administração da planta. Os caprinos 4754, 4755 e 4764 também apresentaram elevações nos valores das bilirrubinas, quando comparados com as amostras coletadas antes da administração,

Quadro 6. *Varição da atividade sérica da enzima fosfatase alcalina (SAP) em caprinos submetidos a intoxicação aguda por Vernonia mollissima*

Número do caprino	Valores da atividade sérica nos diversos tempos após a administração da planta (UI/ml)													
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	42 h	54 h	78 h	102 h	108 h	114 h	120 h	
4751	34	36	37	60	94 <sup>+</sup> a									
4754	42	47	43	46	54	72	75 <sup>+</sup>							
4755	112	138	127	118	264	383	352							
4758	84	80	76	65	83	97	140 <sup>h</sup>	172 <sup>h+</sup>						
4759	48	46	49	53	87	155	156 <sup>+</sup>							
4753	36	38	35	51	64	66	68 <sup>+</sup>							
4760	151	157	150	204	235 <sup>h+</sup>									
4752	89	95	90	87	86	85	81	82	82 <sup>-</sup>					
4757	57	64	63	63	61	61	59	52	60					
4761	217	206	183	174	159	178	168	163	185					
4762	80	87	83	72	93	111	172	259	421	491	486	556	461 <sup>+</sup>	
4763	203	199	184	170	165	186	255	327	287					
4764	270	290	271	230	249	282	306	432	503	640	980	940	980 <sup>+</sup>	
4756	69	64	65	62	59	60	70	75	73					
4768	124	128	130	122	124	118	130	138	136					
4769	128	130	132	138	113	132	185	484 <sup>h</sup>	630 <sup>h</sup>					
4770	112	162	182	144	156	132	122	118	115					

<sup>a</sup> + = somente adoeceu, h = hemólise.

Quadro 7. Quocientes enzimáticos em caprinos intoxicados por *Vernonia mollissima*

	Quociente GGT/AST			Quociente AST/ALT		
	AAP <sup>a</sup>	AIS	AEC	AAP	AIS	AEC
4751	0,40	0,17	0,07	4,2	9,7	15
4752	0,40	0,17	-	4,6	10,0	-
4753	0,47	0,11	0,10	3,6	14,5	14,9
4754	0,45	0,23	0,15	3,4	8,7	8,29
4755	0,63	0,14	0,06	4,3	27,1	30,9
4758	0,59	0,07	0,05	5,1	21,0	17,5
4759	0,33	0,12	0,05	4,1	10,2	11,3
4760	0,30	0,19	0,20	4,1	16,6	16,35
4762	0,31	0,10	0,09	5,3	16,4	13,3
4764	0,56	0,22	0,15	2,6	17,0	29,5

<sup>a</sup>AAP = amostra coletada antes da administração da planta;

AIS = amostra coletada após o início dos sintomas;

AEC = amostra coletada com os animais em estado de coma.

estatística a nível de 5% entre as coletas AAP e AIS, entre AIS e AEC para os seguintes constituintes séricos: AST, ALT, LDH e GGT. Diferença significativa a esse nível entre os parâmetros das coletas AAP e AEC e entre AIS e AEC foi observada para SAP, quociente A/G, globulinas, proteínas totais, BD, BI e BT. Diferença significativa entre as coletas AAP e AIS e entre AAP e AEC para os quocientes AST/ALT e GGT/AST e diferença somente entre as coletas AAP e AEC para as albuminas.

## DISCUSSÃO

No presente trabalho experimental foi obtido, pela administração de doses únicas de *Vernonia mollissima* Don, um quadro de intoxicação aguda, letal, nos cinco animais que ingeriram 10 g/kg, em dois dos quatro que ingeriram 5 g/kg e em dois dos quatro que ingeriram 2,5 g/kg. A dose de 1,25 g/kg não se manifestou tóxica para caprinos. Um caprino (4752) que ingeriu 5 g/kg, adoeceu e recuperou-se com uma evolução de 6 horas, apresen-

Quadro 8. Bilirrubinas séricas em caprinos intoxicados por *Vernonia mollissima* em dose única (mg/100ml)

	BT <sup>a</sup>			BD			BI		
	AAP <sup>b</sup>	AIS	AEC	AAP	AIS	AEC	AAP	AIS	AEC
4751	0,41	0,41	0,62	0,21	0,21	0,31	0,20	0,20	0,31
4752	0,61	0,62	-	0,31	0,31	-	0,30	0,31	-
4753	0,62	0,62	0,82	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,51
4754	0,41	1,03	1,64	0,21	0,51	0,72	0,20	0,52	0,92
4755	0,41	1,03	1,03	0,21	0,41	0,51	0,20	0,62	0,52
4758	0,62	0,62	0,82	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
4759	0,82	1,85	2,86	0,41	0,92	1,33	0,41	0,93	1,53
4760	0,61	0,62	0,62	0,31	0,31	0,21	0,31	0,31	0,20
4762	0,41	0,82	3,08	0,31	0,41	2,26	0,20	0,41	0,82
4764	0,41	0,62	1,44	0,21	0,31	0,72	0,20	0,31	0,72

<sup>a</sup>BT = bilirrubina total, BD = bilirrubina direta, I = BI = bilirrubina indireta.

<sup>b</sup>AAP = amostra coletada antes da administração da planta; AIS = amostra coletada após o início dos sintomas; AEC = amostra coletada com o animal em estado de coma.

porém, esses valores não ultrapassaram os limites normais para a espécie.

As concentrações das proteínas séricas nos caprinos desse experimento, antes da administração da planta, variaram de 4,6 a 8,7 g/dl, com média de 6,45 g/dl, para as proteínas totais, de 2,1 a 3,9 g/dl, com média de 3,27 g/dl, para as albuminas, de 1,8 a 5,3 g/dl, com média de 3,18 g/dl, para as globulinas e de 0,64 a 2,11, com média de 1,12, para o índice alb/glob. Os caprinos 4762 e 4764 apresentaram moderado declínio nas taxas das proteínas totais e das globulinas e conseqüente elevação nos índices albuminas/globulinas (A/G), quando comparados individualmente os valores entre as amostras coletadas antes da administração da planta e os valores das amostras coletadas quando os animais se encontravam em estado de coma (aproximadamente a 120 horas da administração).

A análise estatística dos valores dos constituintes séricos obtidos das amostras coletadas antes da administração da planta (coleta AAP), os valores dos constituintes das amostras coletadas após o início da sintomatologia (coleta AIS) e os valores dos constituintes das amostras coletadas quando os animais se encontravam em estado de coma (coleta AEC) apresentou diferença

tando prostração, anorexia e atonia de rúmen com fracos bracejos. Os demais animais não adoeceram. Intoxicações experimentais não fatais também foram observadas por Döbereiner et al. (1976) e um de dois bovinos que receberam planta dessecada em dose correspondente a 20 g/kg de planta fresca; por Gava (1986) em dois de quatro ovinos que receberam dose correspondente a 5 g/kg; e por Tokarnia et al. (1986) em três de treze coelhos em diferentes dosagens. Nos trabalhos experimentais desses autores, todos os demais animais que adoeceram, morreram, conferindo a *V. mollissima* um quadro tóxico de difícil recuperação.

Os sintomas observados nos caprinos foram semelhantes aos relatados em bovinos (Döbereiner et al. 1976) e em ovinos (Gava 1986). A presença de sintomas nervosos não foi bem evidente em nosso trabalho experimental com caprinos, no entanto, movimentos mandibulares com a boca vazia, apoio da cabeça contra as paredes, torcicolo, movimentos de pedalagem e de rolar sobre si mesmos que foram observados em alguns animais, poderão ser considerados de fundo nervoso de acordo com as citações de Hooper et al. (1974). Sintomas nervosos no curso de graves hepatopatias foram observados por Döbereiner et al. (1969) em três bovinos intoxicados experimentalmente com *Cestrum laevigatum*,

por Hooper et al. (1974) em ovinos intoxicados por lasiocarpina (alcalóide) por Tokarnia & Döbereiner (1983) em dois bovinos intoxicados por *Crotalaria anagyroides* e por Tokarnia & Döbereiner (1984) em dois bovinos intoxicados por *Senecio brasiliensis*. Esses sintomas poderão ser interpretados como manifestações da chamada síndrome hepato-cerebral, atribuída à incapacidade hepática de transformar amônia em uréia, eliminável pelos rins. A hiperamonemia e o excesso de glutamina no líquido céfalo-raquidiano são patogênicamente responsabilizados por esses sinais clínicos. A hiperamonemia pode estar relacionada com a presença de vacúolos no cérebro, no entanto não é um achado constante. Não foi observado processo degenerativo de aspecto esponjoso no cérebro dos animais desse experimento, mesmo nos que apresentaram sintomas nervosos.

No quadro lesional macroscópico foram observadas algumas diferenças com relação aos bovinos e ovinos intoxicados por *Vernonia mollissima*. Nem todos os caprinos apresentaram fígado com aspecto de noz-moscada, além de ser ocasional a presença de sufusões sub-epicárdicas e de ressecamento do folhoso nessa espécie. Essas alterações são constantes em bovinos e ovinos intoxicados por essa planta (Döbereiner et al. 1976, Gava 1986).

Sob o aspecto histológico verificou-se, nos caprinos que morreram com doses de 5 e 10 g/kg e cuja evolução fora inferior a 24 horas, uma necrose de coagulação afetando todo o parênquima hepático, o que está de acordo com as observações em casos experimentais de evolução semelhante descritos por Döbereiner et al. (1976) em bovinos e por Gava (1986) em ovinos. A congestão hepática verificada nos caprinos foi de apresentação irregular e de distribuição variável, predominantemente nas zonas intermediária e centrolobular, o que difere dos relatos dos autores acima citados, onde a congestão se caracterizou por ser centrolobular.

A nível renal, os estudos histológicos nos caprinos que apresentaram uma evolução inferior a 24 horas revelaram degeneração albuminosa granular das células epiteliais dos túbulos uriníferos, em grau leve. Döbereiner et al. (1976) em bovinos e Gava (1986) em ovinos, em casos de intoxicação por *V. mollissima* de evolução semelhante, não relataram lesões nos rins.

Nos caprinos que ingeriram 2,5 g/kg e cuja evolução fora superior a 24 horas, as alterações histológicas a nível hepático mostraram-se menos graves que a dos animais que ingeriram doses maiores. Observou-se desaparecimento das células e marcada congestão centrolobular; vacuolização, tumefação dos hepatócitos com alterações regressivas de seus núcleos na zona intermediária; células tumefactas e com pequenos vacúolos citoplasmáticos, o que confere um aspecto espumoso à zona periférica do lóbulo.

Essas lesões devem ser comparadas com as dos casos de intoxicação por *V. mollissima*, de evolução semelhante, isto é, superior a 24 horas, descritas por Gava (1986) em bovinos, obtidas pela administração de doses sub-letais e repetidas, durante 10 e 11 dias, os quais adoeceram no 6º e 8º dias e tiveram uma evolução de 7 e 8 dias. Num desses casos foi observado desaparecimento de grande parte dos hepatócitos e congestão centrolobular. Das células restantes, muitas apresentaram cariorrexia ou ausência de núcleo e citoplasma bem eosinófilo. Em outras áreas, onde não havia macroscopicamente aspecto de noz-moscada e sim uma coloração alaranjada, foi observada uma dissociação difusa dos cordões hepáticos e vacuolização dos hepatócitos, mais acentuada na zona intermediária. No outro bovino foi observada congestão, leve necrose e marcada vacuolização dos hepatócitos centrolobulares. Estas lesões eram menos intensas nas demais zonas dos lóbulos.

As citadas lesões devem ser comparadas também com as alterações observadas nas intoxicações experimentais com *V. mollissima* em coelhos, com doses únicas, cuja evolução fora de 2 a 7 dias (Tokarnia et al. 1986). Nessa espécie houve acentuada esteatose associada a uma degeneração albuminosa granular vacuolar afetando todo ou maior parte do parênquima hepático.

Os rins dos caprinos cuja evolução fora superior a 24 horas revelaram na histologia, uma marcada degeneração vacuolar com lise da grande maioria das células epiteliais dos túbulos uriníferos. Lesões renais foram observadas também por Gava (1986) ao reproduzir a intoxicação sub-aguda em bovinos, com doses sub-letais repetidas, que caracterizou a lesão renal como uma necrose de coagulação dos túbulos uriníferos, intercalados por túbulos com células de contornos pouco nítidos, além de gotas hialinas citoplasmáticas na junção córtico-medular e alguns túbulos preenchidos por cilindros hialinos. Tokarnia et al. (1986) observaram em coelhos intoxicados experimentalmente por *V. mollissima*, os quais tiveram uma evolução de 2 a 7 dias, a nível renal, necrose de coagulação, com calcificação das massas necróticas, degeneração gordurosa em células epiteliais de túbulos uriníferos e a presença de cilindros hialinos em grande quantidade nos túbulos da medular.

O conjunto desses dados permite concluir que *V. mollissima* possui além de efeito hepatotóxico, também um efeito nefrotóxico, cuja intensidade está possivelmente na dependência da quantidade da planta ingerida e consequentemente do tempo de sobrevivência dos animais intoxicados. Quanto maiores as doses, mais acentuadas foram as lesões hepáticas, mais leves as lesões renais e mais curta a evolução. Enquanto doses menores produziram lesões hepáticas mais leves, tempo de evolução mais longo e lesões renais mais graves.

É interessante fazer também uma comparação com as lesões hepáticas e renais observadas nas intoxicações com outras espécies de Vernónia. Riet-Correa (1986) relata a ocorrência de surtos em bovinos intoxicados por *Vernonia* sp. no Estado de Mato Grosso do Sul, onde observou na histologia, necrose centrolobular com áreas de congestão e hemorragias, além de vacuolização dos hepatócitos nas demais áreas e proliferação de ductos biliares; a nível renal observou uma marcada vacuolização das células epiteliais dos túbulos uriníferos. Dos quatro surtos descritos por esse autor, dois ocorreram no município de Corumbá, região onde já foram observadas mortandades em bovinos por *Vernonia rubricaulis* (Tokarnia & Döbereiner 1982). Esses autores reproduziram a intoxicação experimental em bovinos com *V. rubricaulis* e observaram necrose afetando todo o parênquima hepático e degeneração hidrópico-vacuolar difusa acentuada e esteatose leve a moderada na cortical renal de todos os casos. Com *Vernonia squarrosa*, Tokarnia & Döbereiner (1983) reproduziram a intoxicação experimental aguda em bovinos e ovinos e sub-aguda em um bovino, onde também observaram lesões hepáticas e renais. Nos casos agudos observaram necrose do parênquima hepático, de quase todo parênquima hepático, acompanhada na maioria dos casos de congestão e hemorragias e degeneração vacuolar acentuada nos túbulos uriníferos da cortical renal em parte dos casos, tanto em bovinos como em ovinos. Enquanto, no único caso de evolução sub-aguda em bovinos, observaram no fígado, esteatose difusa, de intensidade leve a moderada, e nos espaços porta leve mas nítida proliferação de fibroblastos e de canaliculos biliares, e no rim acentuada necrose de coagulação das células epiteliais dos túbulos uriníferos contornados na cortical.

Convém lembrar ainda que, nas duas plantas essencialmente nefrotóxicas do Brasil, *Dimorphandra mollis* (Tokarnia & Döbereiner 1967, Santos 1973) e *Thiloua glaucocarpa* (Tokarnia et

al. 1981), as quais só foram estudadas em bovinos, o quadro evolutivo das intoxicações por essas plantas é sempre sub-agudo; as lesões renais são de necrose de coagulação, mas há também lesões hepáticas de menor importância.

Desta maneira sob o ponto de vista do diagnóstico diferencial das intoxicações por *Vernonia mollissima*, devem sempre ser lembradas as plantas hepatotóxicas e as nefrotóxicas, bem como sua distribuição geográfica: *Cestrum laevigatum*, na região Centro-Oeste (Döbereiner et al. 1969), *Cestrum parqui*, na região Sul (Riet-Correa et al. 1984), *Vernonia rubricaulis*, no pantanal mato-grossense (Tokarnia & Döbereiner 1982), *Vernonia squarrosa*, na região Sul (Tokarnia & Döbereiner 1983) e *Dimorphandra mollis*, na região Centro-Oeste (Tokarnia & Döbereiner 1967, Santos 1973). Como *Vernonia mollissima* só ocorre nas regiões Centro-Oeste e Sul, e *Thiloo glaucocarpa* no Nordeste, esta última não precisa ser levada em consideração.

Além de estudar o quadro clínico-patológico das intoxicações, é imprescindível, para o diagnóstico final, o reconhecimento da planta nas pastagens onde ocorre a mortalidade.

Os estudos com *V. mollissima* até agora realizados nas diferentes espécies restringiram-se ao aspecto clínico-patológico. No entanto, as alterações bioquímicas que ocorrem no curso desse processo não receberam a devida atenção. Os constituintes humorais são valiosos para esclarecer os mecanismos patogênicos de um processo, além de serem úteis como auxílio diagnóstico. Discutiremos a seguir alguns constituintes séricos, bem como a atividade sérica de algumas enzimas analisadas no decorrer da intoxicação aguda em caprinos por essa planta.

A hiperbilirrubinemia observada no caprino 4759 e em menor grau nos caprinos 4754, 4755 e 4764, por apresentarem um percentual de BI acima de 50% da BT, e em conformidade com as citações de Gopinath & Ford (1972), Santos (1978), Benjamin (1978) e Coles (1986), indica que é provável existir certo grau de hemólise intravascular em alguns animais intoxicados por *V. mollissima*. Por outro lado, os valores encontrados no caprino 4762, por apresentar 73,4% de BD e 26,6% de BI, além de fluxo biliar normal verificado na necropsia, permitem admitir que esse animal apresentou uma icterícia de origem intra-hepática, possivelmente por oclusão dos canaliculos biliares pela tumefação dos hepatócitos. A maioria dos animais não demonstrou alterações nos níveis séricos das bilirrubinas, permanecendo intacta a função de excretar bilirrubina, o qual está de acordo com a citação de Coles (1986), de que o índice sérico das bilirrubinas não deve ser considerado indicador sensível da função hepática em ruminantes. A localização da lesão hepática é um fato importante para justificar essa ocorrência, visto que, segundo as observações de Gopinath & Ford (1972), lesões centrolobulares tendem a produzir pequenos efeitos sobre a concentração das bilirrubinas, enquanto moderada lesão periportal, desde que afete a integridade da membrana celular resultará em marcada elevação na concentração desses pigmentos na circulação. Outro fato importante que deve ser avaliado é o curto período de evolução apresentado por esses animais. Diante desses fatos, a hiperbilirrubinemia na intoxicação por *V. mollissima*, poderá ser um achado ocasional, dependente da localização da lesão, do tempo de evolução e do grau de hemólise intravascular.

A hipoproteinemia observada nos caprinos 4762 e 4764 foi atribuída à necrose hepática e em certo grau à necrose renal, e só não foi maior e presente em todos os animais que adoeceram em virtude do curto período de evolução do processo (Coles 1986).

Os valores normais da atividade sérica da ALT observados em caprinos desse experimento estão de acordo com os parâmetros citados por Benjamin (1978) e pequenas diferenças foram obser-

vadas quando comparados com os parâmetros obtidos por Rosa (1972) e Dalo & Perez (1980). A elevação da atividade sérica dessa enzima nos animais intoxicados por *V. mollissima* foi um achado inesperado em virtude de sua baixa atividade no tecido hepático de ruminantes (Gopinath & Ford 1969, Benjamin 1978, Coles 1986). Esta elevação que variou de 2 a 10 vezes a atividade verificada antes da administração da planta, pode ser atribuída ao extenso grau de necrose do tecido hepático.

Os parâmetros de AST observados nos caprinos antes da administração da planta estão de acordo com as citações de Benjamin (1978) e inferiores aos parâmetros obtidos por Rosa (1972) e Dalo & Perez (1980). A elevação da atividade dessa enzima pode ser atribuída à extensa necrose hepática e em menor grau à necrose renal, o que está de acordo com as observações de Cornelius et al. (1963), Gopinath & Ford (1969), Adam & Magzoub (1957), Ali & Adam (1978), Ahmed & Adam (1979), Suliman et al. (1982), Barakat et al. (1983), Barri et al. (1983) e Suliman et al. (1983). Entretanto a atividade dessa enzima poderá estar elevada também em processos degenerativos da musculatura esquelética ou cardíaca (Coles 1986), o que exigirá do clínico certificar-se da normalidade do sistema muscular ou cardíaco para interpretar a atividade dessa enzima no curso da necrose hepática.

Os parâmetros normais da atividade sérica da LDH observados nesse experimento foram superiores aos descritos por Kaneko (1974) e similares aos observados por Garnier et al. (1984). A elevação da atividade dessa enzima pode ser atribuída a difusa necrose das células hepáticas e, em menor grau, à necrose das células epiteliais do túbulo urinífero. Por sua distribuição em diferentes tecidos (Benjamin 1978, Coles 1986) a atividade dessa enzima poderá manifestar-se elevada em diferentes circunstâncias, inclusive em soros hemolisados, o que também fora observado em algumas amostras desse experimento. Por essa falta de especificidade a LDH só adquire valor diagnóstico e prognóstico quando associada a outras provas de função hepática ou quando se recorrer à quantificação da LDH<sub>5</sub>, isoenzima hepatoespecífica (Marquéz-Adrián et al. 1977).

A atividade sérica da GGT nos caprinos antes da administração da planta manteve parâmetros similares aos observados por Marquéz-Adrián et al. (1977) em ovinos e bovinos. Ford (1974) ao analisar a GGT em ovinos em que produziu necrose hepática e renal, e ligadura de ductos biliares, observou que a atividade sérica dessa enzima permanece constante nesses processos e por outro lado se eleva consideravelmente em casos de colestase ou nas lesões de ductos biliares. Diante dessas observações e da elevação da atividade sérica observada em caprinos intoxicados por *V. mollissima* é possível admitir a hipótese que no curso desse processo poderão ocorrer colestase ou lesões nos ductos biliares, o que não fora observado histologicamente.

A SAP demonstrou uma atividade sérica muito variável nas amostras coletadas antes da administração da planta; esta observação está de acordo com as citações de Coles (1986), o qual atribui, em função de tal amplitude de valores, pouco valor diagnóstico na insuficiência hepática ou na icterícia obstrutiva dos ruminantes. A elevação da atividade sérica dessa enzima pode ser atribuída à necrose hepática, a certo grau de colestase intra-hepática e também à necrose renal; alguns animais tiveram hemólise intravascular, fato que certamente participou na elevação da atividade sérica dessa enzima, o que também se verificou nas amostras hemolisadas (Benjamin 1978, Coles 1986).

Ao analisarmos o quociente AST/ALT no curso da necrose hepática pela administração de *V. mollissima* em caprinos, verificamos uma considerável elevação o que pode ser atribuído à marcada elevação da atividade da AST. Não é possível comparar es-

tes valores com os observados na enzimologia humana no curso das hepatopatias, visto ser diferente a distribuição tecidual especialmente da ALT.

Por outro lado, o quociente GGT/AST é inversamente proporcional ao grau de necrose hepática, isto é, o quociente diminui no curso da necrose e possivelmente aumentará no curso da colésta sem necrose hepática.

Pelo fato dos quocientes enzimáticos não serem utilizados como rotina na enzimologia veterinária, é necessário estabelecer os padrões destes em outros processos hepatobiliares, para posteriormente serem úteis no diagnóstico diferencial das hepatopatias dos ruminantes.

*Agradecimentos.*- Os autores agradecem ao Setor de Anatomia Patológica da Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Saúde Animal (UAPNPSA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, em especial ao Dr. Jürgen Döbereiner, pelo apoio; à UAPNPSA-Embrapa, em especial ao Dr. Jerome Langenegger, pela oportunidade de realizar os experimentos em suas dependências, e à Dra. Charlotte H. Langenegger, pelo empréstimo de animais; ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte da Embrapa, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, pelo auxílio na coleta da planta; à Seção de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Naval Marçílio Dias, em especial à Dra. Veronica de Santis de Caldas e a sua equipe, pela preciosa colaboração na quantificação enzimática; ao Laboratório Merck, pela doação de Kits para a quantificação de enzimas e outros constituintes séricos; ao Prof. Alberto Figueiredo Penteado, pela orientação estatística; ao proprietário da Fazenda Margarida, Sr. Pedro Dório Passos, e a seus funcionários, pela colaboração na coleta da planta.

## REFERÊNCIAS

- Adam E.E.I., & Magzoub M. 1975. Toxicity of *Jatropha curcas* for goats. *Toxicology* 4:347-354.
- Ali B. & Adam S.E.I. 1978. Effects of *Acanthospermum hispidum* on goats. *J. Comp. Path.* 88:533-544.
- Barakat S.E.M., Wasfi I.A. & Adam S.E.I. 1983. The toxicity of *Aristolochia bracteata* in goats. *Vet. Path.* 20:611-616.
- Barri M.E.S., Onsa, T.O., Elawad A.A., Elsayed N.Y., Wasfi I.A., Bari E.M.A. & Adam S.E.I. 1983. Toxicity of five Sudanese plants to young ruminants. *J. Comp. Path.* 93:559-575.
- Benjamin M.M. 1978. Outline of veterinary clinical pathology. 3th ed. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. 351p.
- Coelho M.N. 1985. Comunicação pessoal (Jardim Botânico, Rio de Janeiro).
- Coles E.H. 1986. Veterinary clinical pathology. 4th ed. Saunders, Philadelphia. 486p.
- Cornelius C.E., Douglas G.M., Gronwall R.R. & Freedland R.A. 1963. Comparative studies on plasma arginase and transaminases in hepatic necrosis. *Cornell Vet.* 53:181-191.
- Dalo N. & Perez M. 1980. Variaciones en los niveles de las transaminases sericas en caprinos intoxicados con *Ipomoea carnea* var. *abutiloides*. *Acta Cientifica Venezolana* 31(1):244.
- 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. Vet. 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.
- Ford E.J.H. 1974. Activity of gamma-glutamyl transpeptidase and other enzymes in the serum of sheep with liver or kidney damage. *J. Comp. Path.* 84:231-243.
- Fundação IBGE. 1983. Anuário estatístico do Brasil. Centro de Serviços Gráficos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, Vol. 44. 988 p.
- Garnier F., Benoit E., Jacquet J.P. & Delatour P. 1984. Enzymologie sérique de la chèvre: valeurs usuelles de CPK, LDH, ICDH et SDH. *Ann. Rech. Vét.* 15(1):55-58.
- Gava A. 1986. Intoxicação experimental por *Vernonia mollissima* Don (Compositae) em ovinos e bovinos. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 46p.
- Gopinath C. & Ford J.H. 1969. The effect of *Lantana camara* on the liver of sheep. *J. Path.* 99:75-85.
- Gopinath C. & Ford E.J.H. 1972. Location of liver injury and extent of bilirubinaemia in experimental liver lesions. *Vet. Path.* 9:99-108.
- Hooper P.T., Best S.M. & Murray D.R. 1974. Hyperamonaemia and spongy degeneration of brain in sheep affected with hepatic necrosis. *Res. Vet. Sci.* 45(3):216-222.
- Kaneko J.J. 1974. Standard values in domestic animals. 3rd ed. Univ. Calif., Davis.
- Márquez-Adrián G., Fratini J.F., Grimoldi R.J., Fernández G., Tamañes F.A. & Williams M.B. 1977. Perfil enzimático en sueros de ruminantes: lactico desidrogenase; gama glutamil transpeptidada; aldolasa; leucin aminopeptidasa colinesterasa. *Gac. Vet.* 39:36-42.
- Pallaske G. & Schmidel E. 1959. Pathologisch-histologische Technik. Paul Parey, Berlin.
- Riet-Correa F., Mendes M.C., Schild A.L. & Pinheiro M.E. 1984. Intoxicação por *Cestrum parqui* em bovinos. Laboratório Regional de Diagnóstico. Relatório de atividades e doenças da área de influência no período de 1983. Pelotas, RS. 35 p.
- Riet-Correa F. 1986. Relatório sobre doenças de bovinos diagnosticadas pela Divisão de Patologia do Hospital da UFMS. Campo Grande, Mato Grosso do Sul.
- Rosa S.M. 1972. Valores de N-uréico, creatinina, fosfatasa alcalina, transaminasas (GOT y GPT), glucosa y colesterol en bovinos, ovinos, caprinos, caballos y perros. Valores de fosfatasa alcalina, GOT y GPT en ratas, hamsters, ratones, cobayos e conejos. *Revta Med. Vet. y Parasitologia* 24:87-102.
- Santos F.C.C. 1973. Intoxicação experimental de bovinos pela "fava" de *Dimorphandra mollis*. Benth. Tese de Mestrado, Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. 37 p.
- Santos J.A. 1978. Patologia especial dos animais domésticos (mamíferos e aves). Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas-OEA, Rio de Janeiro. 661 p.
- Suliman H.B., Wasfi I.A. & Adam S.E.I. 1982. The toxic effects of *Tephrosia apollinea* on goats. *J. Comp. Path.* 92:309-315.
- Suliman H.B., Wasfi I.A., Tartour G. & Adam S.E.I. 1983. The effects of *Indigofera hochstetteri* on goats. *Rev. Elev. Méd. Vet. Pays Trop.* 36(4):393-402.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1967. Intoxicação experimental pela fava da "faveira" (*Dimorphandra mollis* Benth.) em bovinos. *Pesq. Vet. 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 *Thilao 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. 1983. Intoxicação experimental por *Crotalaria anagyroides* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 3(4):115-123.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1983. Intoxicação experimental por *Vernonia squarrosa* (Compositae) em ovinos e bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 3(2):45-52.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1984. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 4(2):39-65.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J., Gava A., Amorim P.R. & Consorte L.B. 1986. Intoxicação experimental em coelhos por *Vernonia mollissima*. *Pesq. Vet. Bras.* 6(1):5-10.

# SOROTIPOS DE *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* ISOLADOS DE SUÍNOS NO BRASIL<sup>1</sup>

ITAMAR A. PIFFER<sup>2</sup>, MARIA APARECIDA V.P. BRITO<sup>2</sup>, JOSÉ REINALDI F. BRITO<sup>2</sup>  
e DAVID EMÍLIO S.N. de BARCELLOS<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Piffer I.A., Brito M.A.V.P., Brito, J.R.F. & Barcellos D.E.S.N. 1985. [Serotypes of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* isolated from swine in Brazil.] Sorotipos de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* isolados de suínos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(3): 79-83. Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA), Embrapa, Caixa Postal D-3, Concórdia, SC 89700, Brazil.

Thirty-three strains of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* biovar 1 were isolated from swine lungs with acute or chronic lesions of swine pleuropneumonia, with one exception, which was isolated from the nasal cavity of a pig from a problem herd. These strains originated from 14 herds, ten located in the State of Santa Catarina, three in Rio Grande do Sul and one in São Paulo. Serotyping was done by rapid slide agglutination (RSA), immunofluorescence (IF), counterimmunoelectrophoresis (CIE) and immunodiffusion (ID). Twenty-two (66%) of the 33 strains could be serotyped, 19 belonged to serotype 5 and three to serotype 3. All serotype 3 strains together with those not possible to be serotyped originated from swine of the same herd, Santa Catarina, one in which serotype 5 was also isolated. The IF and CIE were the most sensitive tests, while the ID was the least sensitive. Three strains could not be serotyped by the RSA because they auto-agglutinated.

**INDEX TERMS:** Swine pleuropneumonia, serotypes, *Haemophilus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Brazil.

**SINOPSE.-** Isolaram-se 33 amostras de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*, biovar 1, sendo que 32 originaram-se de pulmões de suínos com lesões macroscópicas agudas ou crônicas de Pleuropneumonia Suína (PPS) e uma amostra da cavidade nasal de um suíno de granja problema. Estas amostras foram coletadas em 14 propriedades, sendo dez localizadas no Estado de Santa Catarina, três no Rio Grande do Sul e uma em São Paulo. Para a sorotipagem utilizaram-se as técnicas de soroaglutinação rápida (SAR), imunofluorescência (IF), imunoeletrosmoforesis (IEOF) e imunodifusão (ID). Das 33 amostras, 22 (66%) foram sorotipadas e, entre estas, 19 pertenciam ao sorotipo 5 e três ao sorotipo 3. As amostras do sorotipo 3 e aquelas não sorotipadas originaram-se de suínos de uma mesma propriedade do Estado de Santa Catarina, onde também isolou-se o sorotipo 5. Os testes de IF e IEOF foram os mais sensíveis e o de ID apresentou a menor sensibilidade. Três amostras não puderam ser sorotipadas pelo teste de SAR porque auto-aglutinavam.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Pleuropneumonia suína, sorotipos, *Haemophilus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Brasil.

## INTRODUÇÃO

*Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* (Hpp) é o agente primário da Pleuropneumonia Suína (PPS), que se caracte-

teriza por uma pneumonia necrótica e hemorrágica, frequentemente associada a uma pleurisia fibrinosa (Nicolet & Scholl 1981). O primeiro surto desta doença foi descrito na Inglaterra (Mathews & Pattison 1961); em seguida, nos Estados Unidos (Olander 1963) e na Argentina (Shope 1964). Presentemente já existem relatos da ocorrência da PPS em todos os países onde a produção de suínos é intensiva (Nicolet 1985).

No Brasil, a PPS foi diagnosticada, pela primeira vez, por Locatelli et al. (1981). A partir de então vários surtos desta doença foram diagnosticados no Sul do Brasil, onde a suinocultura é praticada de forma mais intensiva (Piffer et al. 1982). Nestes sistemas, os prejuízos são decorrentes de alta mortalidade, na forma aguda, e pouco desenvolvimento, na forma crônica. Acresce a estas perdas o grande número de condenações de carcaças ao abate.

Na avaliação do desempenho econômico de uma unidade de terminação (Protas et al. 1985), acometida de um surto agudo, os prejuízos por morte de animais e despesas com medicamentos equivaleram-se a 31.681 kg de peso de suíno para a venda. Estas perdas referem-se às médias anteriores e posteriores aos três meses de surto.

Baseado nas características de polisacarídeos capsulares foram descritos para o Hpp, biovar 1 (Pohl et al. 1983), nove sorotipos (Nicolet 1971, Gunnarsson et al. 1977, Killian et al. 1978, Rosendal & Boyd 1982, Nielsen & O'Conner 1983, Nielsen 1985, Nicolet 1985).

A importância de se conhecer os sorotipos de Hpp que afetam uma determinada região, reside no fato de que o diagnóstico sorológico é tipo específico (Gunnarsson 1979) e a imunidade obtida por vacinação é expressa somente contra o sorotipo que está

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 23 de abril de 1987.

<sup>2</sup> Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA), Embrapa, Caixa Postal D-3, Concórdia, Santa Catarina 89700.

<sup>3</sup> Instituto de Pesquisa Veterinária "Desidério Finamor" (IPVDF), Caixa Postal 2976, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90000.

contido na vacina (Nielsen 1985). Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de identificar sorologicamente as amostras de Hpp isoladas no Brasil, como subsídio ao diagnóstico, estudos epidemiológicos e imunoprophilaxia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras padrões

Amostras de Hpp, representando os sorotipos de 1 a 5, foram cedidas pelo Dr. Richard F. Ross do Instituto de Pesquisas em Medicina Veterinária, Ames, Iowa, USA. A fonte e referência destas amostras encontram-se indicadas no Quadro 1.

### Amostras de campo

No Quadro 2 estão relacionados os dados referentes às amostras oriundas dos Estados do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina e de São Paulo. Estas amostras foram isoladas de pulmões ou da cavidade nasal de suínos.

Quadro 1. Sorotipos de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*

Sorotipo	Amostras padrões	Referências
1	4074	Shope 1964, Nicolet 1971, Kilian et al. 1978
2	1536	Nicolet 1971, Kilian et al. 1978
3	1421	Nicolet 1971, Kilian et al. 1978
4	1168	Gunnarsson et al. 1977, Kilian et al. 1978
4	1162 <sup>a</sup>	Gunnarsson et al. 1977, Kilian et al. 1978
5	111	Gunnarsson et al. 1977, Kilian et al. 1978

<sup>a</sup> Recebida em agosto de 1986.

As secreções nasais foram coletadas através de swabs. Tanto os swabs como os fragmentos de pulmões foram semeados em meio de ágar com 5% de sangue desfibrinado de carneiro.

Os fragmentos de pulmão foram semeados através de contato direto dos mesmos com a superfície dos meios ou pela técnica de diluições descrita por Little & Harding (1980). Para suprir o fator V, perpendicularmente à semeadura nas placas, cultivou-se em uma linha contínua, uma amostra de *Staphylococcus aureus (S. aureus)*. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, quando então procedeu-se à leitura.

### Identificação das amostras isoladas

As características culturais e morfológicas foram determinadas em cultivos de 24 horas. A dependência do fator X foi determinada utilizando-se o meio de "triptose soy ágar" (TSA), com e sem 5% de sangue de carneiro e utilizando-se *S. aureus* como fornecedor do fator V. A produção de hemólise foi observada no meio TSA e a dependência ao fator V, a presença de urease, reação de "CAMP-test" e utilização de esculina, trealose, monitol e rafinose foram determinadas de acordo com técnicas descritas por Kilian & Frederiksen (1981). Amostras que foram "CAMP-test" negativas ou de reação duvidosa, foram submetidas a este teste, nos moldes descritos por Kilian & Frederiksen (1981), mas utilizando-se ágar sangue contendo 0,1% de nicotinamidaadeninadineucleotídeo (NAD)<sup>4</sup>.

### Produção de antisoros

Antisoros contra as amostras referência foram produzidos em coelhos de acordo com procedimentos descritos por Gunnarsson et al. (1977). Cada antisoro foi absorvido com um sorotipo heterólogo com o intuito de remover anticorpos comuns à espécie.

### Técnicas de sorotipagem utilizadas

As técnicas utilizadas para a sorotipagem das amostras isoladas foram:

<sup>4</sup> Sigma.

Quadro 2. Amostras de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* isoladas de suínos no Brasil

Amostras	Localidade	Ano	Estado	Propriedade	Sorotipo	Técnica de sorotipagem utilizada <sup>a</sup>			
						SAR	IF	IEOF	ID
463/81	Chapecó	1981	SC	1	5	+	+	+	+
PS/SR	Santa Rosa	1981	RS	2	5	+	+	+	+
362/82	Concórdia	1982	SC	3	5	+	+	+	+
PS/225	Seara	1982	SC	4	5	+	+	+	+
596/82	Criciúma	1982	SC	5	5	+	+	+	+
1 amostra	Faxinal dos Guedes	1982	SC	6	NS	-	-	-	-
400/83	São Sebastião	1983	SC	7	5	+	+	+	+
401/83	Rondinha	1983	SC	8	5	+	+	+	+
361/83	Faxinal dos Guedes	1983	SC	6	3	AA <sup>b</sup>	+	+	+
991/83	Faxinal dos Guedes	1983	SC	6	5	+	+	+	+
PS/ER	Erechim	1983	RS	9	5	-	-	+	-
515/84	Faxinal dos Guedes	1984	SC	6	3	+	+	+	-
FG/10/P1	Faxinal dos Guedes	1984	SC	6	5	NR	+	-	-
FG/10/P5	Faxinal dos Guedes	1984	SC	6	5	NR	+	+	-
592/84	Faxinal dos Guedes	1984	SC	6	5	AA	+	+	-
PS/85	Seara	1985	SC	10	5	+	+	+	+
374/85	Irani	1985	SC	11	5	+	+	+	+
487/85	Xanxerê	1985	SC	12	5	+	+	+	+
691/85	Campinas	1985	SP	13	5	+	NR	+	NR
1016/85	Xanxerê	1985	SC	12	5	+	+	+	NR
1151/85	Casca	1985	RS	14	5	+	+	+	NR
1169/85	Faxinal dos Guedes	1985	SC	6	3	+	+	+	NR
334/85	Xanxerê	1985	SC	12	5	+	+	NR	NR
10 amostras	Faxinal dos Guedes	1985	SC	6	NS	-	-	-	NR

<sup>a</sup> SAR = Soroaglutinação rápida, IF = imunofluorescência direta, IEOF = imunoelctrosmofores, ID = imunodifusão.

<sup>b</sup> Autoaglutinação.

soroaglutinação rápida (SAR) (Rapp et al. 1985), imunofluorescência direta (IF), imunoelctrosmoforescência (IEOF) (Piffer et al. 1986) e imunodifusão (ID) (Nielsen & O'Connor 1983).

Para o teste de IF utilizou-se globulinas precipitadas por sulfato de amônio, dos antisoros obtidos contra as amostras padrões, e conjugadas com isotiocianato de fluoresceína, pela técnica de diálise (Goldman 1968). Fluoresceína livre foi removida através de filtração em Sephadex-G-25. O teste de IF foi conduzido como segue: esfregaços de colônias dos sorotipos padrões e das amostras a serem tipadas, em lâminas de vidro, foram fixados em solução tamponada de formol a 10%, por 10 minutos. A coloração das lâminas foi realizada segundo Goldman (1968). Os soros conjugados foram titulados com amostras homólogas através de diluições duplas (1:2 até 1:128). A fluorescência foi avaliada como segue: 0 = sem fluorescência, 1 = leve vislumbre das bactérias esverdeadas, sem formas definidas e brilho, 2 = bactérias com forma distinguível, esverdeada, sem contornos bem definidos e brilho, 3 = bactéria com a periferia bem delimitada, apresentando uma cor amarela esverdeada com brilho e 4 = similar a 3 mas com brilho mais intenso. Somente os graus 3 e 4 foram considerados com reações específicas. A diluição de trabalho de cada soro foi aquela que apresentou o grau mais intenso de fluorescência e que não apresentou reação cruzada com os outros sorotipos.

## RESULTADOS

Todas as amostras isoladas, exceto uma, originaram-se de pulmões de suínos com sinais clínicos e lesões macroscópicas agudas ou crônicas de pleuropneumonia.

A amostra 991/83 (Quadro 1) foi isolada da cavidade nasal de um suíno pertencente a uma granja com um surto agudo de pleuropneumonia.

Em sangue desfibrinado de carneiro, as colônias de Hpp isoladas apresentaram satelitismo ao *S. aureus*, crescimento em 24 horas, com colônias variando entre 1 e 2 mm e com grau diverso de hemólise. Ao Gram apresentaram-se como pequenos bastonetes pleomórficos e Gram-negativos. Todas as amostras eram NAD-dependentes, urease positivas, utilizaram monitol e não o fizeram com esculina e trealose. Ao "CAMP-test", utilizando-se apenas ágar sangue, 16 amostras foram positivas, variando a reação de fraca a moderada; sete apresentaram reação duvidosa e nove foram negativas. Quando se utilizou NAD no meio de ágar sangue o número de amostras positivas subiu para 27, havendo seis negativas. Aqui também observaram-se reações fracas a moderadas.

Nos testes de SAR, IEOF e ID, onde o antisoro era utilizado sem diluir, algumas reações cruzadas entre os sorotipos padrões foram observadas. No teste de IF, o processo de diluição dos antisoros eliminou quase que por completo as reações cruzadas. Após a adsorção dos soros hiperimunes com uma amostra padrão heteróloga, as reações cruzadas foram eliminadas, exceto entre os sorotipos 4 e 5. Procedendo-se a adsorção cruzada entre estes sorotipos eliminou-se totalmente, tanto as reações cruzadas como as homólogas, em todos os testes, sugerindo identidade sorológica. Por outro lado, a amostra 463/81 (Quadro 2) foi sorotipada pelo Dr. Nicolet, Universidade de Berna, Suíça, como sendo sorotipo 5. Esta amostra apresentou reação positiva, em todos os testes, frente aos antisoros 4 e 5, adsorvidos com o sorotipo 1, indicando que o antisoro contra o sorotipo 4 não era específico. Além disso, utilizando-se uma nova amostra 1162 (Quadro 1) para o sorotipo 4, observou-se que no teste de SAR, já na diluição de 1:2, o antisoro contra o sorotipo 5 não apresentava reação cruzada. Estes fatos eliminaram o antisoro contra o sorotipo 4 do diagnóstico.

No Quadro 2 estão sumarizados os dados referentes às amostras isoladas. Observa-se que das 33 amostras de Hpp, 22 (66%) foram sorotipadas e, entre estas, 19 (86%) pertenciam ao soroti-

Quadro 3. Amostras de *Haemophilus* (*Actinobacillus*) pleuropneumoniae isoladas de suínos da propriedade 6

Amostra	Ano	Sorotipo	Técnicas de sorotipagem utilizadas <sup>a</sup>			
			SAR	IF	IEOF	ID
3921/82	1982	NS <sup>b</sup>	-	-	-	-
361/83	1983	3	AA <sup>c</sup>	+	+	+
991/83	1983	5	+	+	+	+
515/84	1984	3	+	+	+	+
FG/10/P1	1984	5	NR <sup>d</sup>	+	-	-
FG/10/P5	1984	5	NR	+	+	-
592/84	1984	5	AA	+	+	-
924/P1	1985	NS	-	-	-	NR
924/P2	1985	NS	-	-	-	NR
924/08B	1985	NS	-	-	-	NR
941/91-7	1985	NS	-	-	-	NR
960/91-1	1985	NS	-	-	-	NR
960/91-6	1985	NS	-	-	-	NR
960/91-12	1985	NS	-	-	-	NR
960/91-16	1985	NS	-	-	-	NR
960/91-19	1985	NS	-	-	-	NR
960/91-22	1985	NS	-	-	-	NR
1169/85	1985	3	+	+	+	NR

<sup>a</sup> SAR = Soroaglutinação rápida, IF = imunofluorescência direta, IEOF = imunoelctrosmoforescência, ID = imunodifusão;

<sup>b</sup> Não sorotipado;

<sup>c</sup> Autoaglutinação;

<sup>d</sup> Não realizado.

po 5, enquanto que três ao sorotipo 3. O sorotipo 3 foi detectado em apenas uma propriedade (Quadro 3), enquanto que o sorotipo 5 o foi em todas as 14 propriedades onde houve a ocorrência da doença clínica, inclusive naquela onde se isolou o sorotipo 3 (Quadro 3). Desta propriedade originaram-se também todas as amostras não sorotipadas.

Entre as amostras sorotipadas o SAR foi eficiente em 17/19 oportunidades (89%), o IF e o IEOF em 20/21 (95%) e o ID em apenas 12/17 (70%). Além disso, três amostras foram autoaglutinantes e portanto impróprias ao SAR. Nota-se ainda que a amostra PS/ER e a FG/10/PI foram sorotipadas apenas por uma das técnicas, ou seja, respectivamente pelo IEOF e IF.

## DISCUSSÃO

As características culturais, tintoriais e bioquímicas de todas as amostras isoladas são consistentes com aquelas descritas por Hpp (Biberstein et al. 1977) e, de acordo com Pohl et al. (1983), todas elas pertenciam ao biovar 1 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, por serem todas NAD-dependentes. O não isolamento de amostras NAD-independentes (biovar-2) talvez esteja relacionado à ausência destas amostras em nosso meio ou devido a sua menor patogenicidade (Pohlenz et al. 1978), uma vez que os isolamentos foram obtidos de pulmões afetados e/ou devido a que, no isolamento primário, houve preocupação apenas com bactérias que apresentaram satelitismo ao *S. aureus*. Amostras NAD-independentes foram isoladas na Europa (Bertschinger & Seifert 1978), mas não nos Estados Unidos (Rapp et al. 1985). A existência destas amostras foi um dos critérios que levou a proposta de transferência do gênero *Haemophilus* para *Actinobacillus* (Pohl et al. 1983).

Hpp é descrito como "CAMP-test" positivo, enquanto que amostras de *Haemophilus* sp, "Grupo menor" e *Haemophilus* sp, "Grupo C" são negativas (Nicolet & School 1981). Por outro lado, o sorotipo 7 de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* foi descrito por Rosendal & Boyd (1982) como "CAMP-test" negativo. Esta mesma amostra e a amostra padrão para o "Grupo menor" apresentaram reação fraca de "CAMP-test" quando o mesmo foi realizado em meio enriquecido (Rapp et al. 1985). A utilização de diferentes meios pode explicar a discrepância observada, assim como a subjetividade em discriminar uma reação fraca de uma reação negativa. Estes fatos limitam a utilização do "CAMP-test" na classificação de *Haemophilus* sp isolados de suínos.

Os resultados são claros quanto a importância do sorotipo 5 para o Sul do Brasil, principalmente para o Estado de Santa Catarina. O porquê da ocorrência deste sorotipo pode ser especulado em duas direções: importações e intensificação das condições de criação de suínos nos últimos anos. De acordo com os relatórios da Associação Brasileira de Criadores de Suínos (ABCS), no período de 1971 a 1975, o Brasil importou 3243 reprodutores, sendo que 40% originaram-se dos Estados Unidos, 21% da Holanda, 20% da Alemanha e 10% da Inglaterra. Além disso, menores importações ocorreram da Bélgica, Suécia e Dinamarca. No período de 1976 a 1979 praticamente não houve importações. Porém, de acordo com relatórios da ABCS e da Federação das Associações de Suinocultores do Brasil, observou-se um aumento de importações no período de 1980 a 1983. Em 1980, ano que antecedeu o diagnóstico da PPS no Brasil, ocorreram maiores importações da Holanda, Estados Unidos, Suécia e Canadá. Para o Estado de Santa Catarina foram destinados animais de todos estes países, menos da Suécia. Nos anos de 1981 a 1983 as maiores importações foram da França, Estados Unidos e Holanda. Observando-se a prevalência de sorotipos de Hpp nos países acima mencionados, observa-se que o sorotipo 5 é prevalente nos Estados Unidos, Canadá, Holanda e Bélgica (Rosendal et al. 1981, Schultz et al. 1982, Sebunya & Saunders 1983, Nicolet 1985). Estes fatos sugerem que a infecção por Hpp, sorotipo 5, possa ter sido introduzida por importações de suínos dos Estados Unidos, Canadá e Holanda, principalmente para o Estado de Santa Catarina. Um rastreamento sorológico poderia comprovar ou não esta hipótese.

Outro aspecto a considerar é de que esta infecção existiria há bastante tempo em nosso meio e, em função do confinamento e intensificação da produção a doença realmente apareceu. Isto é corroborado pelo fato de que Piffer et al. (1982), estudando a ocorrência da PPS, na Região Sul do Brasil, onde a mesma ocorreu com graves prejuízos econômicos, identificaram alguns pontos em comum entre os sistemas afetados: a) produção de terminados a partir de leitões de várias origens; b) utilização de sistema contínuo de produção; e c) terminações com capacidade superior a 600 animais.

O sorotipo 3 foi isolado em apenas uma propriedade, apesar deste sorotipo ocorrer em todos os países citados, exceção da Holanda e Dinamarca (Nicolet 1985). É bom salientar que as tentativas de isolamento de Hpp ocorreram em materiais com lesões sugestivas de PPS e, sendo o sorotipo 3 menos patogênico do que os outros (Pehlenz et al. 1978) sua ocorrência e consequente importância podem estar subestimadas. Por outro lado, amostras pertencentes ao sorotipo 3 já foram isoladas de pulmões com pneumonias agudas (Hunter et al. 1983). As amostras não sorotipadas também originaram-se da mesma propriedade (Quadro 3). Elas podem representar um novo sorotipo ou serem mu-

tantes dos sorotipos 5 e 3 já isolados destas propriedades. Presentemente produz-se antisoros contra o restante dos sorotipos, os quais servirão para elucidar a composição antigênica destas amostras. A ocorrência de amostras não sorotipáveis é um fato comum (Schultz et al. 1982 e Rapp et al. 1985) e pode significar dissociação de lisa para rugosa.

No que tange aos métodos para sorotipagem observou-se que nenhum deles sozinho foi suficiente para sorotipar toda as amostras isoladas, embora o IF e o IEOF falhassem em apenas uma oportunidade.

O teste de SAR, embora simples, rápido e sensível (Rapp et al. 1985) apresenta o inconveniente de ser inaplicável em amostras autoaglutinantes (Quadros 2 e 3). Os testes de IF e IEOF possuem a mesma sensibilidade e são superiores ao teste de ID (Piffer et al. 1986). Em relação a especificidade não se observaram maiores problemas, pois a utilização do processo de diluição e a adsorção heteróloga eliminaram completamente as reações cruzadas, devido aos antígenos comuns à espécie.

Uma explicação, porém bastante especulativa, para a aparente identidade entre os sorotipos 4 e 5, poderia ser a da ocorrência dos antígenos 4 e 5 no clone utilizado para imunizar contra o sorotipo 4, como foi observado em amostra de campo (Rapp et al. 1985) associada a uma resposta imune fraca dos coelhos imunizados.

Em relação a sorotipagem pode-se concluir que o melhor procedimento seria submeter primeiro as amostras isoladas ao SAR e, caso negativo aos testes de IF e/ou IEOF.

*Agradecimentos.*- A assistência técnica de Ana A.F. Botovchenco, Maria B.B. Fávero, Marni Ramenzoni e Mauro Alves Ribeiro.

## REFERÊNCIAS

- Bertschinger H.V. & Seifert P. 1978. Isolation of a *Pasteurella haemolytica*-like organism from porcine necrotic pneumonia (Abstr. 1119). In: Proc. 5th Int. Pig Vet. Soc. World Congr., Zagreb, Yugoslavia.
- Biberstein E.L., Gunnarsson A. & Huvell B. 1977. Cultural and Biochemical criteria for the identification of *Haemophilus* spp from swine. Am. J. Vet. Res. 38:7-11.
- Goldman M. 1968. Fluorescent antibody methods. H.B. Jonanovich, New York.
- Gunnarsson A., Biberstein E.L. & Huvell B. 1977. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus paraahaemolyticus (pleuropneumoniae)*. Agglutination reactions. Am. J. Vet. Res. 38: 1111-1114.
- Gunnarsson A. 1979. Evaluation of different antigens in the complement-fixation test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae (paraahaemolyticus)* infections in swine. Am. J. Vet. Res. 40(11): 1564-1567.
- Hunter D., Junes M.A. & McKenchy T. 1963. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates using ring precipitated test. Vet. Res. 113: 158.
- Killian M., Nicolet J. & Biberstein E.L. 1978. Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Mathews and Pattison 1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain. Int. J. Syst. Bacteriol. 18: 20-26.
- Killian M. & Frederiksen W. 1981. Identification tables for the *Haemophilus-Pasteurella-Actinobacillus* group, p. 281-290. In: Killian M., Frederiksen W. & Biberstein E.E. (ed.), Academic Press, London.
- Little T.W.A. & Harding J.D.J. 1980. Interaction of *Haemophilus paraahaemolyticus* and *Pasteurella multocida* in the respiratory tract of the pig. Br. Vet. J. 136(4): 371-383.
- Locatelli J.C., Machado A. & Silva A.S. 1981. Ocorrência de pleuropneumonia suína devido a *Haemophilus pleuropneumoniae*, p. 203. In: Anais do 2º Ciclo de Atualização em Medicina Veterinária, Lages, SC. (Resumo)

- Mathews P.R.J. & Pattison I.H. 1961. The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig. *J. Comp. Pathol.* 71:44-52.
- Nicolet J. 1971. Sur l'hémophilase du porc. III. Différenciation serologique de *Haemophilus parahaemolyticus*. *Zbl. Bakt.* 16: 487-495.
- Nicolet J. & School E. 1981. *Haemophilus* infections, p. 368-377. In: Lemmon A.D., Glock R.D. & Mengeling W.L. et al. (ed): *Disease of Swine*. 5th ed. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa.
- Nicolet J. 1985. *Haemophilus pleuropneumoniae* bacteriology and epidemiology, p. 7-11. In: Schultz R.A. (ed.): *Compendium on swine Haemophilus pleuropneumoniae*. Singler Printing, Ames, Iowa.
- Nielsen R. & O'Conner P.J. 1983. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 8. *Acta Vet. Scand.* 25: 96-106.
- Nielsen R. 1985. *Haemophilus pleuropneumoniae*. Diagnosis, immunity and control, p. 18-22. In: Schultz R.A. (ed.), *Compendium on swine Haemophilus pleuropneumoniae*. Singler Printing, Ames, Iowa.
- Olander H.J. 1963. A septicemic disease of swine and its causative agent, *Haemophilus parahaemolyticus*. PhD Thesis, Univ. California, Davis.
- Piffer I.A., Brito M.A.V.P., Sobestiansky J. & Wentz I. 1982. Pleuropneumonia suína. I. Alguns aspectos epidemiológicos da doença em nosso meio, p. 45. In: An. Congr. Bras. Med. Vet., Camboriu, Santa Catarina.
- Piffer I.A., Carter G.R. & Botovchenco A.A.F. 1986. Identification of serotypes of *Haemophilus pleuropneumoniae* by counterimmunoelectrophoresis. *Vet. Res.* 118: 252-294.
- Pohl S., Bertochinger H.V., Frederiksen W. & Mannheim W. 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumoniae to the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int. Syst. Bact.* 33: 510-514.
- Pohlenz J., Bertschinger H.V., Ehrensperger F. & Seifert P. 1978. Pathomorphologic lesions in lungs of pigs spontaneously or experimentally infected with *Pasteurella haemolytica*-like organism. In: Proc. 5th Int. Pig Vet. Soc. World Congr., Zagreb, Yugoslavia.
- Rapp V.J., Ross R.F. & Zirmmermann B.E. 1985. Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody test in swine. *Am. J. Vet. Res.* 46: 185-192.
- Rosendal S., Lambin L. & Moor J. 1981. Serotyping and detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* by indirect fluorescent antibody technique. *Can. J. Com. Med.* 45: 271-274.
- Rosendal S. & Boyd D.A. 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. *J. Clin. Microbiol.* 16: 840-843.
- Protas J.F. da S., Sobestiansky J., Wentz I. & Piffer I.A. 1985. Custo de um surto de pleuropneumonia suína. *Pesq. Agropec. Bras.* 20(2): 241-244.
- Sebunya T.N.K. & Saunders J.R. 1983. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: A review. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 182: 1331-1337.
- Shope R.F. 1964. Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. *J. Exp. Med.* 119: 357-358.
- Schultz R.A., Young T.F., Ross R.F. & Jeske B.R. 1982. Prevalence of antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* in Iowa swine. *Am. J. Vet. Res.* 43: 1848-1851.

# ENZOOTIC CALCINOSIS IN SHEEP CAUSED BY THE INGESTION OF *Nierembergia veitchii* (Solanaceae)<sup>1</sup>

FRANKLIN RIET-CORREA<sup>2</sup>, ANA LUCIA SCHILD<sup>2</sup>, MARIA C. MÉNDEZ<sup>2</sup>, ROBERT WASSERMAN<sup>3</sup>  
and LENNART KROOK<sup>4</sup>

SINOPSE.- Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C., Wasserman R. & Krook L. 1987. [Calcinose enzoótica em ovinos causada pela ingestão de *Nierembergia veitchii* (Solanaceae).] Enzootic calcosinosis in sheep caused by the ingestion of *Nierembergia veitchii* (Solanaceae). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(3) 85-95. Laboratório Regional de Diagnóstico, Fac. Veterinária, UFPel, Pelotas, RS 96100, Brazil.

Descreve-se em ovinos, no Rio Grande do Sul, uma doença caracterizada por emagrecimento progressivo, hipercalcemia, atrofia das células das paratireóides, hiperplasia das células C da tireóide, osteopetrose, osteonecrose e calcificação dos tecidos moles. Ovinos de ambos sexos e todas as idades exceto lactentes são afetados. A hipercalcemia ocorre desde outubro a fevereiro, época em que os ovinos consomem a planta calcinogênica *Nierembergia veitchii*. A incidência da doença é variável entre anos e fazendas, com aparente correlação com a disponibilidade da planta nas pastagens. Experimentos em pintos raquíticos demonstraram que *N. veitchii* possui ação biológica similar à vitamina D, já que a adição da planta na dieta estimulou a absorção de cálcio, a deposição de cálcio na tíbia, e também aumentou a síntese de calbindin-D (proteína complexante do cálcio induzida pela vitamina D sintetizada no intestino) e os níveis plasmáticos de cálcio e fósforo.

Pintos foram alimentados com dietas contendo altas concentrações de SrCl<sub>2</sub> que inibe o sistema de hidrolase renal. Uma partida de *N. veitchii* secada e moída, agregada à dieta com SrCl<sub>2</sub>, estimulou a síntese de pequenas quantidades de calbindin-D, mas não causou aumento na absorção de cálcio. Outra partida de planta foi totalmente inativa. Esses dados sugerem que *N. veitchii* contém um composto similar a 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Os resultados variáveis entre as duas partidas poderiam ser devidas a instabilidade da substância na planta, diferenças na sua preparação ou outro fator desconhecido. As dificuldades em demonstrar em forma clara e constante a presença de uma substância de ação biológica similar a 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> em *N. veitchii*, poderia ser devido à administração de doses insuficientes da planta. As possibilidades de que a planta no campo contenha suficientes quantidades de um composto similar a 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> para causar calcinose, ou de que a calcinose seja causada por outro fator da planta requerem posterior atenção.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Ovinos, intoxicação por planta, *Nierembergia veitchii*, hipercalcemia, hipoparatiroidismo, hipercalcitoninismo, osteopetrose, calcificação dos tecidos moles.

ABSTRACT.- A chronic debilitating disease with hypercalcemia, parathyroid cell atrophy, C cell hyperplasia, osteopetrosis, osteonecrosis, and soft tissue calcosinosis is described in sheep in southeastern Rio Grande do Sul, Brazil. Sheep of both sexes and all ages, except suckling lambs, are affected. Hypercalcemia occurs from October through February during which time sheep on pasture have access to the calcinogenic plant *Nierembergia veitchii*. The incidence of the disease varies between years and farms with apparent correlation to the

availability of the plant. Experiments in rachitic chicks demonstrated a vitamin D-like activity in *N. veitchii* since the addition of the plant to the diet stimulated calcium absorption, uptake of calcium by the tibia and also increased the amount of calbindin-D (the vitamin D induced protein synthesized by the intestinal mucosa) and the calcium and phosphorus plasma levels. Chicks were fed a diet containing a high concentration of SrCl<sub>2</sub> which inhibits the formation of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> by the renal hydroxylase system. Adding a dried, ground preparation of one batch of *N. veitchii* to the SrCl<sub>2</sub> diet stimulated the synthesis of small quantities of intestinal calbindin-D (CaBP), but did not cause an increase in calcium absorption. Another batch of the plant was totally inactive. These data suggest that *N. veitchii* does contain a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-like compound. The variable results between the two batches might be explained on the basis of lability of the substance in these plants, differences in preparation or other unknown reasons. The failure to demonstrate the presence of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-like activity in *N. veitchii* in a clear and constant way may be that an insufficient amount of the plant was fed. Whether, in the field, *N. veitchii*

<sup>1</sup> Accepted for publication on April 30, 1987.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by EMBRAPA/UEPAE-Pelotas.

<sup>2</sup> Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, UFPel, 96100 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.- Fellowship holder from CNPq.

<sup>3</sup> Department of Physiology, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA.

<sup>4</sup> Department of Pathology, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University.

contains sufficient amounts of the  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  - like substance to cause calcinosis or that calcinosis is due to other factors in the plant, requires further attention.

INDEX TERMS: Sheep, plant poisoning, *Nierembergia veitchii*, hypocalcemia, hypoparathyroidism, hypercalcaionism, osteopetrosis, soft tissue calcinosis.

## INTRODUCTION

Enzootic calcinosis in domestic animals has been reported from many parts of the world. The disease in cattle has been shown to be caused by ingestion of *Solanum malacoxylon* in Argentina (Carrillo & Worker 1967), Brazil (Döbereiner et al. 1971) and Uruguay (Riet-Correa et al. 1975). *Trisetum flavescens* causes an enzootic calcinosis in Germany (Dirksen et al. 1972) and in Austria (Libiseller et al. 1976) and *Cestrum diurnum* ingestion affects cattle (Krook et al. 1975b) and horses (Krook et al. 1975a) in Florida, USA. *Solanum torvum* has been associated with calcinosis in cattle in Papua, New Guinea (Copland 1975, Morris et al. 1979).

Similar conditions of uncertain etiology have been described in cattle in Hawaii (Lynd et al. 1965) and Jamaica (Arnold & Bras 1956), in sheep in South Africa (Tustin et al. 1973) and India (Gill et al. 1976) and in goats and sheep in Israel (Newman et al. 1973, 1977).

*Cestrum diurnum* has been suggested as the cause of the disease in Hawaii and Jamaica (Gimeno 1977) and *Solanum sodomaeum* has been mentioned in connection with the disease in Hawaii (Ross et al. 1971).

Excessive feeding with poultry waste has been related to an outbreak of enzootic calcinosis in sheep in Israel (Newman et al. 1977).

Enzootic calcinosis in Brazilian sheep has been recognized since 1968 as described in farms in the municipality of Julio de Castilhos, Rio Grande do Sul (Barros et al. 1970). The disease has been reproduced experimentally in rabbits (Riet-Correa et al. 1981) and sheep (Riet-Correa et al. 1980) by administration of *Nierembergia veitchii*<sup>5</sup>.

The objectives of the present work were to determine the epidemiology and pathology of enzootic calcinosis caused by *N. veitchii* in sheep in Rio Grande do Sul, Brazil, and to study the calcinogenic properties of the plant.

## MATERIAL AND METHODS

The study concerned 12 farms in the municipalities of Piratini, Pinheiro Machado and Lavras do Sul, Rio Grande do Sul. This area is a hilly country with variable amounts of bush; the soil is

<sup>5</sup> Description of the plant: *Nierembergia veitchii* Hook, family Solanaceae. Reference: Sacco et al. 1982. Ervas daninhas do Brasil. Embrapa, DID, Brasília, p. 30.

Material examined: Rio Grande do Sul, Pinheiro Machado, F. Riet s.n(R); Piratini: J. Sacco 2.573 et al. (R).

The plants are prostrated, beardless or pilous. Their leaves are pilous, alternated or opposited, isomorphous, ovates, obovates, elliptical or oblonged, attenuated in the base, measuring 1 to 3.5 cm long and 0.4 to 1.7 cm wide. The flowers are solitaires, axillaries, white bluish or lilac, measuring until 6 cm long; the caliche is pilous, with 5 foliaceous lanceolated or obovated lacinia; the corolla is pilous-glandulous, with a largely campanulate leaf-blade and 5 rounded lobes with simple hairs which are thickened in the apex of the median nervures; the filaments are connivant and the stigma has a semilunar shape and is not embracing the stamen.

described as *Haplumbrept* by the US Department of Agriculture and as *Rankers* by the FAO classification (Lemos et al. 1973).

Epidemiologic data were obtained annually by visits to each farm in which the disease was diagnosed, from 1978 to 1985.

Jugular vein blood samples from 16 grazing sheep in a paddock with a history of calcinosis were collected monthly from September 1978 to October 1979. Serum calcium was determined by the method of Ferro and Ham as modified in commercial kits (Lab Test<sup>(R)</sup>). Serum magnesium was determined colorimetrically with commercial kits (Merckotest<sup>(R)</sup>). Whole blood inorganic phosphorus was determined by the method of Fiske and Subbarow as modified by Gomori (1942).

Six sheep with clinically diagnosed disease were used for pathology examinations. They included 4 wethers, 3 of which were approximately 2 years old, one about 1 year old, and 2 ewes about 4 to 5 years old. They were terminated by exsanguination.

Soft tissues were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned at 6  $\mu\text{m}$  and stained with hematoxylin and eosin (HE), von Kossa, PAS-Alcian Blue and van Gieson stains (Luna 1968). Two millimeter sections were excised mid-sagittally from the proximal humerus and femur epiphysis-metaphysis, and transversely from the mid-diaphysis of these bones. The slices were fixed in 10% formalin and demineralized under partial vacuum in a solution of formic acid and sodium citrate (Luna 1968). Paraffin embedded sections were cut at 6  $\mu\text{m}$  and stained with HE.

Thick slices of formalin fixed bones were excised as above, re-fixed in absolute alcohol for 1 week with 3 changes, embedded in methylmethacrylate and ground to 60  $\mu\text{m}$ .

The ground sections were taped to Kodak High Resolution Plates (Eastman Kodak Rochester, NY, USA) and exposed in a custombuilt microradiographic unit (Westenskow Co., Salt Lake City, Utah, USA) at 10 kVp and 10 mA for 10 minutes.

Quantitative morphometry of the parathyroid glands was done by projecting medium-high magnification color slides of the glands on a paper with 50 rows of 40 dots equally spaced. Cytoplasmic and nuclear "hits" were scored for each row and the cytoplasm to nuclear ratio was recorded. The  $\bar{x} \pm \text{s.e.m.}$  of the 50 rows was then calculated and the data from different sheep were compared by the test.

Selected specimens of formalin fixed thyroid glands were cut into small blocks, washed in buffer, postfixed in 1.5% osmium tetroxide, dehydrated through alcohols and propylene oxide and embedded in epon. One-micron sections were stained with toluidine blue and from these, areas were selected for ultra thin sectioning. Ultra thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate for electron microscopy.

Four experiments were developed in order to elucidate the calcinogenic properties of *Nierembergia veitchii* (NV). The plant administrated in experiments I and II was collected during November 1978, dried in the shade and ground; NV used in experiments III and IV was collected during November 1979, deep frozen at  $-30^\circ\text{C}$ , ground and lyophilized.

*Experiment I.* One-day-old chicks were raised on Cornell rachitogenic diet for 20 days. At this time they were divided in 3 groups of 5 chicks each. Group 1 was maintained on the rachitogenic diet, in group 2 the diet was supplemented with 1200 international units (IU) of vitamin  $\text{D}_3$ , and in group 3 with 2% of NV. At 8 days, absorption of  $^{47}\text{Ca}$  from a ligated duodenal loop, tibia uptake of  $^{47}\text{Ca}$  and mucosal calbindin- $\text{D}_{28}$  (CaBP) were determined by previously described methods (Wasserman et al. 1976).

**Experiment II.** Chicks were raised for 3 weeks on a commercial chick starter diet (Agway) and then divided into 3 groups, 5 chicks per group. The control group received a complete semi-purified diet, containing 1.3% Ca, 0.8% phosphorus and 1200 IU vitamin D<sub>3</sub> per kg, group 2 received a diet containing 0.1% Ca, 0.85% phosphorus, 2.7% strontium as SrCl<sub>2</sub> and 1200 IU vitamin D<sub>3</sub>/kg and group 3 received a diet containing 0.1% Ca, 0.85% P, 2.7% strontium and 2% of NV. After a 5-day feeding period the same parameters were determined as in experiment I.

**Experiment III.** Four groups of 6 chicks each, were fed with Cornell rachitogenic diet from age 1 day to age 24 days. Then the diet was supplemented in the following way: group 1, control; group 2, 1200 IU vitamin D<sub>3</sub>/kg; group 3, 2% dried ground *Cestrum diurnum*; and group 4, dried ground NV. After 7 days feeding, duodenal <sup>47</sup>Ca absorption and duodenal CaBP were determined as previously mentioned. Blood was drawn from the bifurcation of the aorta; plasma Ca was determined by atomic absorption, and plasma phosphorus by a modification of the procedure of Fiske and Subbarow with the use of an autoanalyzer (Technicon).

**Experiment IV.** One-day-old chicks were fed commercial starter ration for 24 days and then divided into 4 group of six or seven chicks per group. Group 1 received a complete semipurified diet, containing 1.2% Ca, 0.8% P and 1200 IU vitamin D<sub>3</sub>/kg. Group 2 received a diet containing 1.2% Ca, 0.8% P, 1.4% strontium and 1.200 IU vitamin D<sub>3</sub>/kg. Groups 3 and 4 received the same diet as group 2 supplemented with 2% *Cestrum diurnum* and 10% NV, respectively, but without vitamin D<sub>3</sub>. After a 5 day feeding period, the same parameters were determined as in experiment III.

RESULTS

1. Epidemiology and clinical signs

The disease was seasonal with the first clinical cases occurring in October and the last ones in January or February.

Sheep of both sexes were affected and the disease occurred in sheep of all ages except in suckling lambs.

The frequency of calcosinosis varied between farms and between years. There was also variation within farms, i.e., between different paddocks within farms. Deaths never occurred in some paddocks while mortality as high as 61.5% was recorded in one camp, in farm 1, during 1977-78. Occurrence, morbidity and/or mortality rates are presented in Table 1.

*Nierembergia veitchii* (Hook), a plant of the *Solanaceae* family (Fig. 1 and 2), was constantly present in amounts proportional to the severity of the disease in each camp.

Affected sheep suffered a pronounced weight loss. There was extreme retraction of the ventral abdominal wall which resembled a Greyhound belly. The gait was stiff and more severe in the pelvic than in the thoracic limbs. The stiffness was most severe when the animals tried to get up. The sheep exhibited a mild kyphosis.

Death could occur after a progressive course of 2 to 3 months or suddenly after the animals were handled during dippings, shearing or deworming.

The animals seemed to improve when changed to a paddock where the disease did not occur, or after February. Clinical signs could, however, be permanent.

Table 1. Occurrence, morbidity and/or mortality of calcosinosis in sheep from 1977 to 1986 in 12 farms a

Season	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
	MB <sup>b</sup>	MT <sup>c</sup>	MB	MT	MB	MT	MB	MT	MB	MT	MB	MT	MB	MT	MB	MT	MB	MT	MB	MT	MB	MT	MB	MT
77-78 <sup>d</sup>	80	22	80	ND <sup>e</sup>	70	25	ND	3	6	2	2	2	2	ND	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
78-79	78	16	NO <sup>f</sup>		1	ND	6	2	6	2	4	2	2	ND	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
79-80	2.5	0.5	NO		2	ND	NO	NO	80	20	4	ND	3	1	20	6	ND	7.5	50	7.5	1	1	1	1
80-81	NO	NO	NO		NO	NO	NO	NO	5	ND	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
81-82	NO	NO	NO		NO	NO	NO	NO	NO	NO	ND	15	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
82-83	10	5	NO		3	1	NO	NO	85	25	NO	NO	2	1	25	0.5	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
83-84	NO	NO	NO		3	0.5	NO	NO	NO	NO	NO	NO	4	2	ND	2.5	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
84-85	NO	NO	NO		NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	ND	1	NO	NO	NO	NO	NO	10	2	ND
85-86	NO	NO	NO		1	ND	NO	NO	18	13	NO	NO	1	ND	NO	10	2	NO	NO	NO	NO	NO	ND	5
Nº of sheep	900		2000		250		260		270		100		1100		570		400		1000		300		400	
Paddock affected <sup>g</sup>	6/6		1/12		2/5		1/5		1/1		1/3		2/6		4/4		2/6		2/3		1/2		6/6	
County	PMh		PM		PM		PM		PIR <sup>i</sup>		PIR		PIR		PIR		PIR		PM		PM		LAVJ	

a In farms 1,2,3 and 4 the disease was diagnosed for the first time in 1977-78; in farms 5,6 and 7 in 1978-79; in farms 8,9 and 10 in 1979-80 and in farms 11 and 12 in 1984-85.  
 b Morbidity %.  
 c Mortality %.  
 d Spring 1977 and Summer 1978.  
 e Not determined.  
 f The disease did not occur.  
 g Total of paddocks Paddock affected.  
 h Pinheiro Machado.  
 i Piratini.  
 j Lavras do Sul.

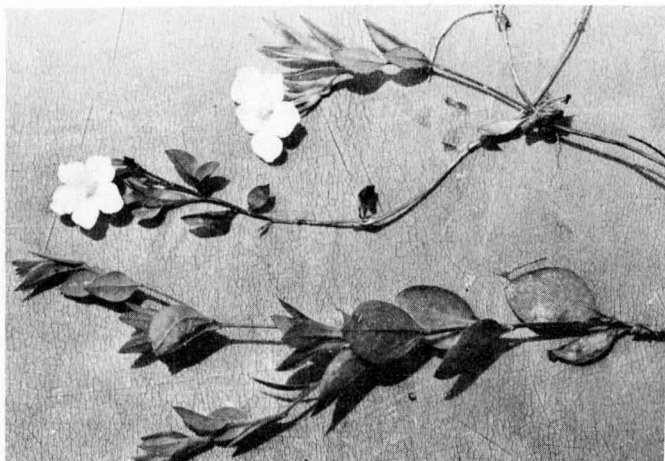


Fig. 1. *Nierembergia veitchii*. Municipality of Pinheiro Machado, Rio Grande do Sul.

## 2. Clinical pathology

Monthly means of serum calcium are presented in Fig. 3.

Serum calcium rose sharply and significantly from September and October and remained high through February. There was then a more gradual return to the September lower values.

Serum magnesium and whole blood inorganic phosphorus concentrations underwent no significant changes during the year.

## 3. Anatomic pathology

a. *Macroscopic examination.* The fat depots were depleted but there was no serous atrophy. The major arteries, with the exception of the pulmonary arteries, were hard, thick and inelastic along their entire length. The intimal surface was rough and covered by mineralized plaques of irregular shape and size (Fig. 4). The degree of mineralization was less severe in the thoracic than in the abdominal aorta in two sheep.

Three sheep had mineralization of the jugular veins at sites of previous venipuncture. All sheep showed mineralization of the bicuspid valves which were hard and thick. The aortic valves were also thick with loss of elasticity and appeared as rigid plaques. In one case endocardial mineralization was observed in the left ventricular wall.

In the lungs of five sheep, and mainly around the acute margin of the diaphragmatic lobes, there were areas where the tissue was inelastic, with a pumice stone-like appearance. The surface and cut surface of affected areas were grey and dry. The remaining lung showed a moderate emphysema.

The kidneys of all sheep showed focal, whitish areas of mineralization in the cortex and homogenous, whitish streaks in the medulla.

Many tendons and ligaments were calcified and the tendinous part of the diaphragm showed opaque and rough plaques of mineralization.

The thyroid glands of two sheep showed white spots of varying size on the cut surface.

The wall of the uterus of two ewes was markedly thickened, hard and inelastic because of severe mineralization.

The articular cartilage of many joints was eroded and showed white, granular areas. The coxo-femoral and carpometacarpal joints were most commonly affected.

The liver of one sheep showed pronounced chronic passive hyperemia and in 2 sheep there were moderate hydrothorax and ascites.



Fig. 2. Flowers of *Nierembergia veitchii* growing in the pasture. Pinheiro Machado, Rio Grande do Sul.

b. *Microscopic examination of soft tissues.* In the intima and media of the aorta, the elastic fibers were swollen, eosinophilic and fragmented. These degenerated fibers showed an increase in acid and neutral mucopolysaccharides. Such fibers were the site of mineralization, first as fine granular deposits which increased in amounts; subsequently the fibers could not be visualized due to large plaques that were structureless and completely mineralized. The collagen fibers and the ground substance were also involved in the same processes.

The degenerate fibers underwent chondroid metaplasia in rare instances.

The mineralized areas were usually surrounded by granulation tissue with fibroplasia and infiltration of lymphocytes, plasma cells and multinucleated giant cells, the latter sometimes in large numbers. In this fibrous tissue, chondroid and osseous metaplasia occurred and the osseous plaques were occasionally of impressive size (Fig. 5).

Other elastic and muscular arteries exhibited lesions similar to those of the aorta. The internal elastic membrane was

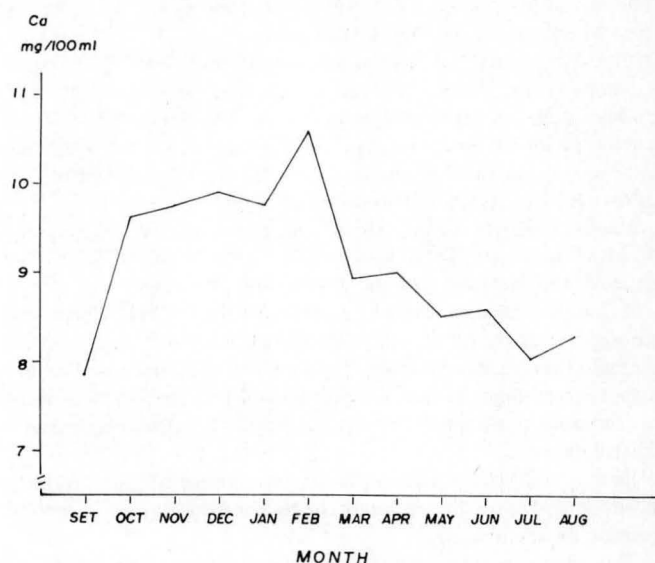
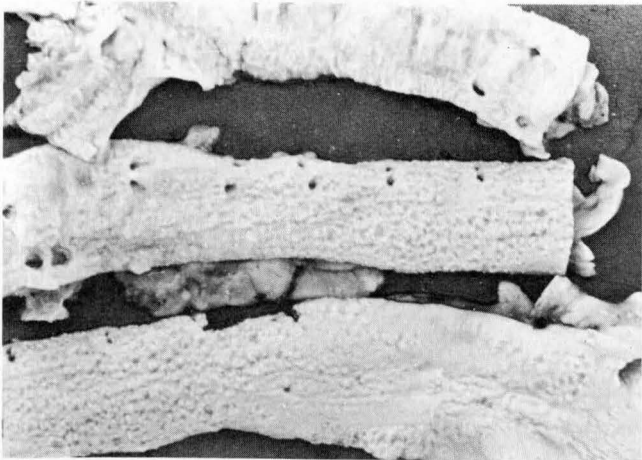
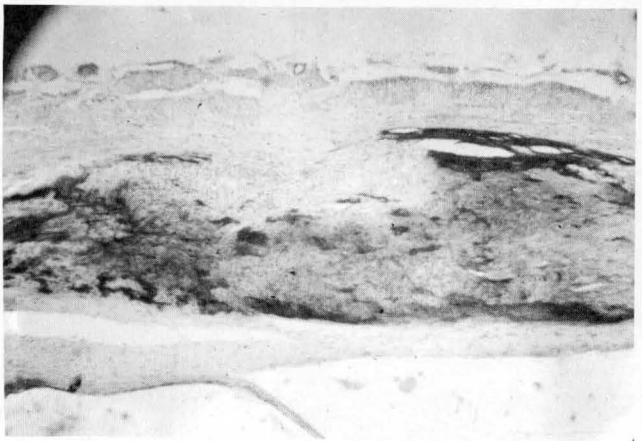


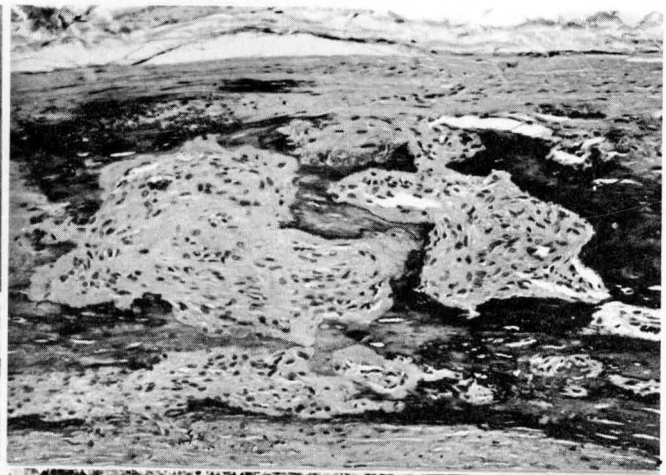
Fig. 3. Monthly means of serum calcium from September 1978 to October 1979 of 16 sheep from an affected farm.



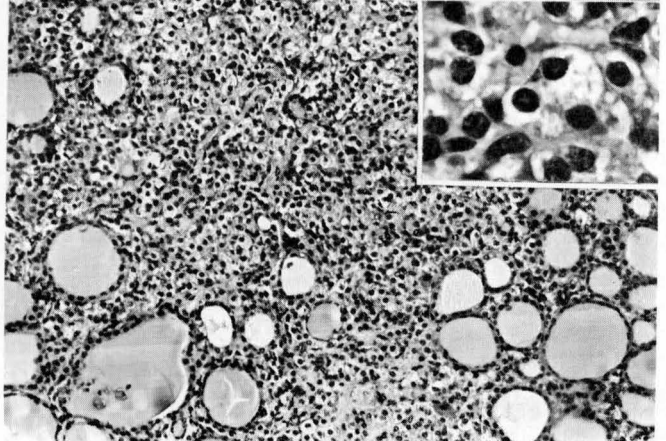
4



6



5



7

Fig. 4. Aorta from an affected sheep with severe mineralization of the intimal surface.

Fig. 6. Tendon from an affected sheep showing severe calcification. HE, obj. 4.

Fig. 5. Aorta of an affected sheep with osseous metaplasia into a large calcified plaque. HE, obj. 10.

Fig. 7. Thyroid from an affected sheep with C cell hyperplasia. HE, obj. 10. Insert higher power of C cells.

degenerated and calcified. Some muscle fibers showed the same changes. The arterial lesions were observed in severe degree in the uterus and to a variable degree in skeletal muscle, forestomach, abomasum, intestine, thyroid gland, lymph nodes and in the spleen.

The heart of one sheep showed degeneration, necrosis and calcification of muscle fibers and replacement by fibrous tissue.

The changes in tendons and ligaments were comparable to those in the arteries. Both elastic and collagen fibers were involved (Fig. 6).

Interlobular septae of the lungs were severely swollen, degenerated and calcified. In some areas, the alveolar epithelium was of the cuboidal type. Bronchial and tracheal cartilage showed restricted areas of dystrophic calcification.

The kidneys showed severe calcinosis of the arteries. There was fibrous thickening of Bowman's capsule. The interstitium was increased and sometimes the site of dystrophic calcinosis. The basal membrane with the tubular epithelium, mainly of collecting tubules, was degenerated. Calcification also involved the epithelium which was sometimes desquamated; calcified casts sometimes obliterated the tubular lumen.

The parathyroid glands examined were from three sheep; one terminated in early January, one at the end of February and one in May. The first parathyroid glands were collected at a time of

abundant supply of *N. veitchii*, the second when the amount of the plant in the pastures had decreased, and the third set was collected after 2-3 months without access to the plant.

In the May parathyroid glands, the cells were large with extensive cytoplasm. The cytoplasm to nucleus ratio was  $2.87 \pm 0.18$  ( $\bar{x} \pm \text{s.e.m.}$ ). In the January parathyroids, there was a severe reduction in the amount of cytoplasm and the nuclei were, accordingly, spaced much more closely together. The cytoplasm to nucleus ratio was  $1.71 \pm 0.10$ . The difference between the May and January ratios was significant at  $P < 0.001$ .

The parathyroid glands collected at the end of February had a cytoplasm to nucleus ratio of  $2.39 \pm 0.15$ . The mean was approaching that of the May parathyroid gland but was still significantly lower ( $P < 0.05$ ).

The seasonal changes in the cytoplasm to nucleus ratio of the parathyroid chief cells were caused by changes in the amount of cytoplasm. The mean diameter of the January and February chief cells was not significantly different from the May value.

Five sheep showed pronounced C cell hyperplasia (Fig. 7). In 3 animals hyperplastic C cells were observed mainly in multiple layers around the follicles or distributed between them. In the 2 sheep with macroscopic white spots in the thyroids, such lesions were constituted by hyperplastic C cells, sometimes arranged in

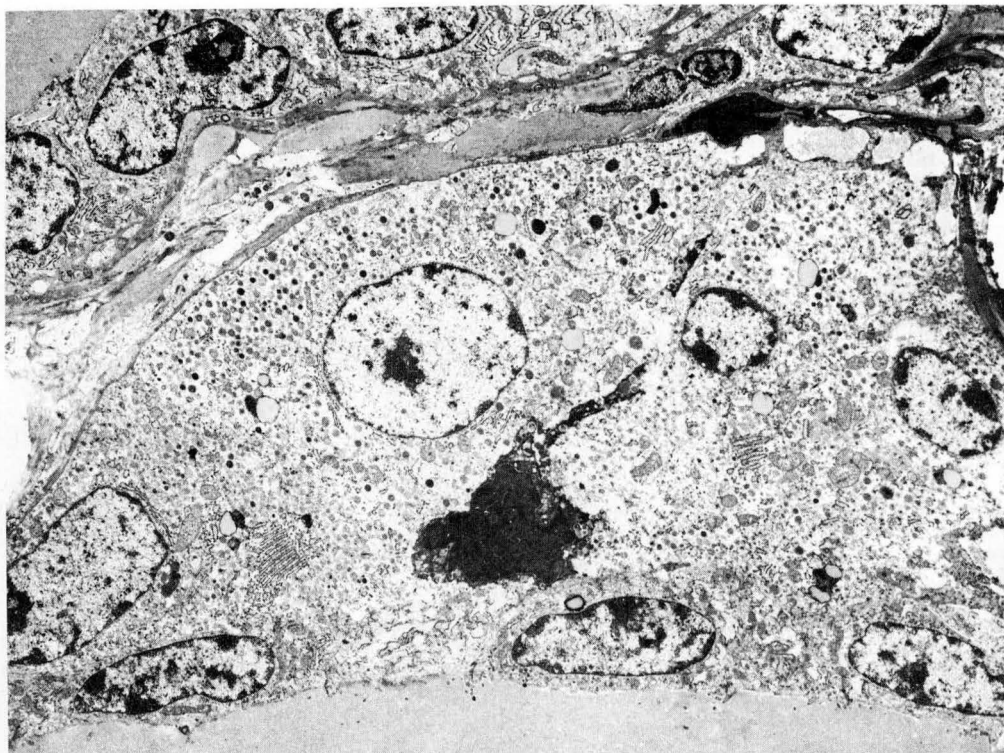


Fig. 8. Electron micrograph of the thyroid from an affected sheep. Hypertrophic C cells are present in the wall of the follicle but do not contact the follicular lumen. Some C cells have numerous secretory granules, others few x 6250.

Table 2. The effect of *Nierembergia veitchii* on duodenal  $^{47}\text{Ca}$  absorption, tibia uptake of  $^{47}\text{Ca}$  and mucosal CaBP in chicks (Experiment I)<sup>a</sup>

Group	Addition to rachitogenic diet	Absorption of $^{47}\text{Ca}$ from duodenal loop (% dose) <sup>b</sup>	Tibia uptake of $^{47}\text{Ca}$ (% dose)	Mucosal CaBP ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)
1	-	28.9 $\pm$ 5.6	1.6 $\pm$ 0.24	1.3 $\pm$ 0.3
2	Vitamin D <sub>3</sub>	90.4 $\pm$ 1.6	3.39 $\pm$ 0.07	54.8 $\pm$ 2.1
3	NV (2%)	57.9 $\pm$ 7.8	2.24 $\pm$ 0.30	6.7 $\pm$ 0.2

<sup>a</sup> Values represented mean $\pm$ SEM.

<sup>b</sup> Absorption period = 20 min.

nodules, measuring 0,1 to 0,3 mm wide and separated by fibrous tissue.

c. *Ultrastructural alterations in the thyroid.* C cells were observed distending the parafollicular space and also within the basement membrane of the follicle but not in contact with the follicular lumen (Fig. 8). Some C cells had numerous granules whereas others contained very few. Some C cells were hypertrophic and others had degenerated. Stacks of rough endoplasmic reticulum were present in many C cells. The follicular epithelium was flattened and atrophic and contained no secretory granules.

d. *Microscopic and microradiographic examination of bone.* All animals had severe osteopetrosis (Fig. 9, 10 and 11), characterized by enlargement and confluence of trabeculae in the epiphysis and metaphysis. The epiphysis showed a mixture of osteonic and trabecular bone. Transverse bands of bone, parallel to the epiphyseal plate were observed in the metaphysis (Fig. 12).

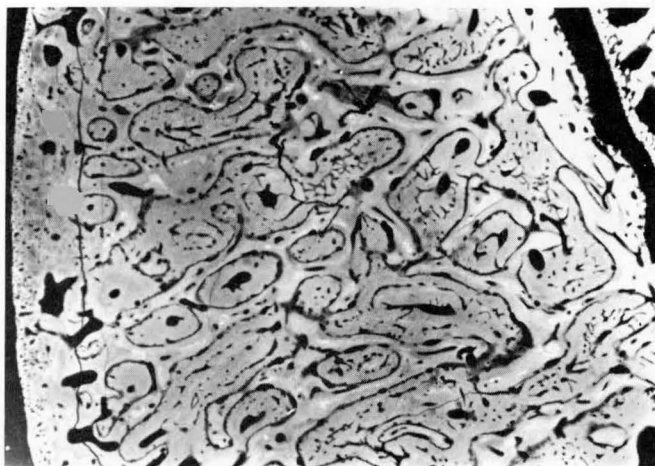
In diaphyseal bone the cortex was very thick, with small Haversian canals and poor differentiation between primary and secondary osteons.

Another striking alteration was the presence of wide basophilic lines within, or at the surfaces of bones (Fig. 10 and 11). Such lines were more common in trabecular bone, but were also observed parallel to the periosteum or concentrically located around Haversian canals. These were characterized by a fibrillar material with lack of birefringency and in some cases with trapped osteocytes and osteocytic lacunae. In microradiographs, these lines appeared as black lines of low mineral density, causing a mosaic pattern (Fig. 9). Such structures were different from cementing lines which were also observed (Fig. 12).

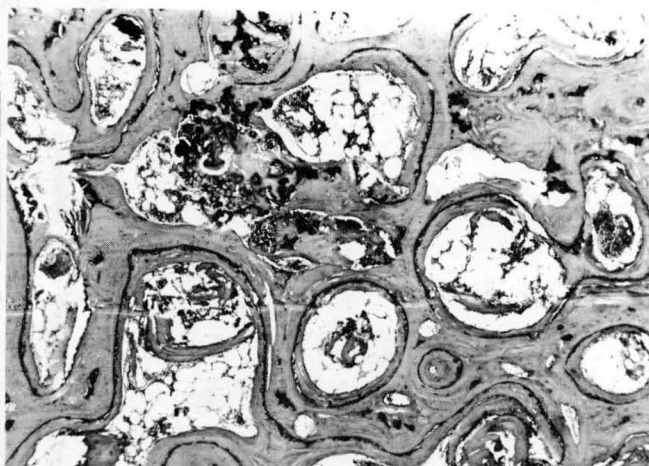
Osteocytes in the center of the wide trabecular and in interstitial lamellae were frequently dead with empty lacunae; this osteonecrosis sometimes resulted in desintegration of bone tissue (Fig. 12).

Articular cartilage showed poor differentiation into vesicular cartilage, with a dense layer of compact bone attached directly to the cartilage cells. Near half of the epiphyseal plate was resting cartilage, and differentiation into columnar and vesicular cartilage was very poor. There was very little primary spongiosa and, in some occasions, a layer of bone, forming the distal terminal plate, was attached directly to the cartilage. Dense transverse trabeculae were frequently observed in secondary spongiosa (Fig. 12).

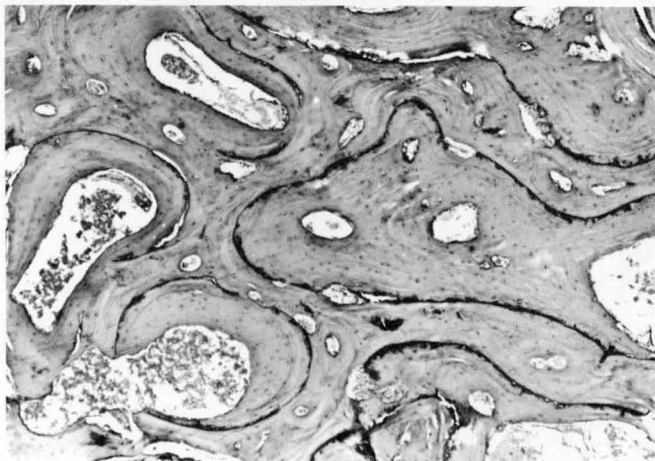
Retention of chondroid core was also observed in epiphyseal and metaphyseal trabeculae (Fig. 12). Occasionally large areas of cartilage were trapped in bone (Fig. 10). In metaphysis and on some occasions in epiphysis, the presence of such cartilage was due to downgrowth of articular and epiphyseal cartilage, but in



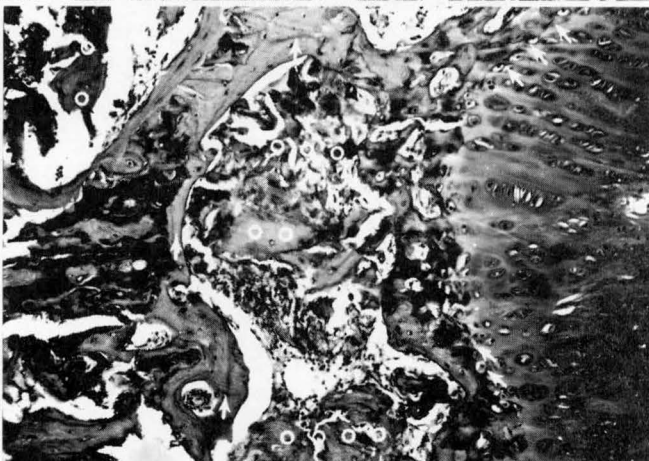
9



10



11



12

Fig. 9. Microradiograph of the proximal humerus epiphysis of an affected sheep. Very severe osteopetrosis. Numerous black lines of low mineral density in the periphery of osteons and in trabeculae cause a mosaic pattern.

Fig. 10. Proximal humerus epiphysis of an affected sheep showing osteopetrosis, basophilic lines in the osteons and trabeculae, a piece of cartilage trapped in bone (C) and osteonecrosis in some areas. HE, obj. 4.

Fig. 11. Basophilic lines in the proximal humerus epiphysis of an affected sheep. HE, obj. 10.

Fig. 12. Proximal epiphyseal cartilage and metaphysis of an affected sheep. Epiphyseal cartilage at top showing very poor differentiation of cartilage cells with no vesicular cartilage cells. Distal terminal plate is formed (in front of oblique arrows). Necrotic bone indicated by open circles. In the transverse trabeculae in the lower part are large amounts of chondroid core and cementing lines in front of horizontal arrows. HE, obj. 10.

the epiphysis there was also cartilage trapped in bone near or in connection with the epiphyseal plate, indicating that it originated from resting cartilage of the epiphyseal plate.

4. Calcinosis in cattle

On farm 10 the disease was observed in cattle during February 1980. In a herd of 300 cows, 10 showed a considerable loss of weight. Affected animals were removed to another farm without *N. veitchii*. After transportation, one cow which had its limb accidentally broken was slaughtered; severe mineralization of the aorta was found. The mean serum calcium of the 10 affected animals in February was 9,7 mg/100 ml; in May, 3 months after removal, the mean serum calcium of the same animals was of 8,3 mg/100 ml, significantly lower (P 0.05) than the previous determination. Mean serum calcium of 10 clinically unaffected cows which stayed on the farm were 9,55 mg/100 ml in February and 9,0 mg/100 ml in April.

5. Effect of *N. veitchii* on calcium absorption and CaBP synthesis in chicks

As shown in Table 2, the addition of vitamin D<sub>3</sub> to the diet of rachitic chicks resulted in an increased absorption of the test dose of <sup>47</sup>Ca, which was also reflected in the greater uptake of <sup>47</sup>Ca by the tibia in the vitamin D<sub>3</sub>-supplemented chicks. The addition of *N. veitchii* to the diet similarly increased <sup>47</sup>Ca absorption, tibia uptake of the absorbed <sup>47</sup>Ca and stimulated the synthesis of CaBP, as did vitamin D<sub>3</sub> supplementation. These results clearly indicated that *N. veitchii* contains a vitamin D-like substance since for the induction of CaBP synthesis there is an absolute requirement for vitamin D through its metabolites.

It was previously shown that the addition of high concentrations of SrCl<sub>2</sub> to low calcium diets produced a physiological vitamin D deficiency even in the presence of dietary vitamin D<sub>3</sub>. This treatment inhibits the synthesis of the vitamin D hormone, 1,25-dihydroxycholecalciferol, by the renal

Table 3. *The effect of Nierembergia veitchii on duodenal <sup>47</sup>Ca tibia uptake of <sup>47</sup>Ca and mucosal CaBP in Strontium chicks (Experiment II)<sup>a</sup>*

Group	Sr diet	Addition to diet	Absorption of <sup>47</sup> Ca from duodenal loop (% dose) <sup>b</sup>	Tibia uptake of <sup>47</sup> Ca (%dose)	Mucosal CaBP (μ g/mg protein)
1	-	Vit. D <sub>3</sub>	65.4±3.9	2.08±0.15	10.2±0.7
2	+	Vit. D <sub>3</sub>	40.0±2.0	1.22±0.06	(0.18) <sup>c</sup>
3	+	NV (2%)	40.4±2.2	1.20±0.08	1.83±0.2

<sup>a</sup> Values represented mean±SEM.

<sup>b</sup> Absorption period = 20 min.

<sup>c</sup> All CaBP in this group were "zero" except one value of 1.08 μ g/mg protein.

enzyme system and thereby depresses calcium absorption and inhibits CaBP synthesis. As shown in Table 3, the addition of SrCl<sub>2</sub> to the diet significantly decreased <sup>47</sup>Ca absorption, the uptake of absorbed <sup>47</sup>Ca by the tibia and inhibited CaBP synthesis by the enterocytes. The supplementation of the diet with 2% *N. veitchii* did not enhance <sup>47</sup>Ca absorption and therefore there was no increase in tibia <sup>47</sup>Ca uptake. However, there was a small but significant stimulation of CaBP synthesis by the plant. This observation strongly suggests that *N. veitchii* does contain a 1,25-dihydroxycholecalciferol-like substance. However, the amount of the putative vitamin D-like hormone in the plant was apparently insufficient to elicit a change in <sup>47</sup>Ca absorption.

In experiments with another batch of *N. veitchii*, the stimulation of the <sup>47</sup>Ca absorption process and CaBP synthesis in vitamin D-deficient chicks was demonstrated (Table 4). In the same experiment, it was also shown that another calcinogenic plant, *Cestrum diurnum* was also effective. When this batch of *N. veitchii* was fed to strontium-fed chicks, no effect on <sup>47</sup>Ca absorption or CaBP synthesis was observed whereas *C. diurnum* increased <sup>47</sup>Ca absorption and CaBP synthesis, demonstrating the presence of the 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-like substance contained there in (Table 5).

The differences in the response of the strontium-fed chicks to the two batches in terms of inducing the synthesis of CaBP cannot be readily explained but could be due to differences in the methods of preparation of the plant material or year-to-year differences (cf. Material and Methods section) in the content of the 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-like substance in these plants. In any event, the data on CaBP synthesis by strontium-fed chicks (Table 3) does suggest that *N. veitchii*, under certain growth and/or preparatory conditions, does contain a small quantity of a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-like substance.

## DISCUSSION

The clinical and pathological characteristics of the disease was similar to those described for other calcinosis in sheep, goats, cattle and horses as mentioned in the Introduction. The experimental reproduction of the intoxication in sheep (Riet-Correa et al. 1980) and rabbits (Riet-Correa et al. 1981), as well as the demonstration of vitamin D like activity in *Nierembergia veitchii* (NV), confirmed this plant as the causative agent of the disease.

The intoxication was characterized by seasonal hypercalcemia. In the experiment during 1979-80, serum calcium increased in October, remained high until February and decreased from March. The first clinical cases coincided with the increase in serum calcium and new cases were observed through February. The seasonal occurrence of the disease coincided with the biologic cycle of NV. At the end of August, small amounts of the plant were observed on pastures, the amounts were considerable by October, persisted at high levels during spring and disappeared in March.

In the following years morbidity and mortality were very variable depending always on the amount of plant present in pastures, which is probably related to climatic variations.

In many farms, there was a decrease in the incidence of the disease after its first diagnosis. This was probably due to the management measures which consisted in the withdrawal of sheep from the camps with large quantities of NV from November to February.

The intoxication occurred almost exclusively in sheep, but cattle could be also be affected, as it was observed in farm 10 in February 1980. The difference in morbidity between sheep and cattle is apparently based in the different pasture habits. NV is a

Table 4. *Effect of Nierembergia veitchii on duodenal <sup>47</sup>Ca absorption, CaBP synthesis, and plasma Ca and P levels in rachitic chicks (Experiment III)<sup>a</sup>*

Group	Addition to rachitogenic diet	Duodenal <sup>47</sup> Ca absorption (%) <sup>b</sup>	Duodenal CaBP (μ g/mg protein)	Plasma Ca(mg/100 ml)	Plasma P(mg/100 ml)
1	-	28.8±4.9	0	6.6±0.2	3.6±0.2
2	Vitamin D <sub>3</sub>	92.4±1.6	48.3±4.5	11.0±0.2	4.7±0.2
3	Cd (2%)	86.5±1.5	52.4±2.3	10.2±0.2	4.8±0.2
4	Nv (10%)	92.2±1.0	52.7±2.4	10.8±0.3	5.4±0.2

<sup>a</sup> Data given as mean±SEM.

<sup>b</sup> Absorption period = 20 min.

Table 5. Effect of *Nierembergia veitchii* on duodenal  $^{47}\text{Ca}$  absorption, CaBP synthesis, and plasma Ca and P levels in Strontium-fed chicks (Experiment IV)<sup>a</sup>

Group	Sr	Addition to diet	Duodenal $^{47}\text{Ca}$ absorption <sup>b</sup> (%)	Duodenal CaBP ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	Plasma Ca (mg/100 ml)	Plasma P (mg/100 ml)
1	-	Vit. D <sub>3</sub>	74.9±2.9	11.3±1.0	11.5±0.2	5.4±0.2
2	+	Vit. D <sub>3</sub>	38.6±4.2	0.4±0.3	9.8±0.1	5.0±0.2
3	+	Cd (2%)	53.0±4.4	8.5±1.0	9.8±0.1	5.3±0.3
4	+	Nv (10%)	42.1±2.5	0.6±0.3	9.8±0.2	4.8±0.1

<sup>a</sup> Data given as mean±SEM.

<sup>b</sup> Absorption period = 20 min.

plant that creeps between the pasture grasses, and is thus more likely to be consumed by sheep than cattle. In addition, large doses of NV are necessary to cause intoxication in experimental animals (Riet-Correa et al. 1980), which means that cattle probably do not eat enough of the plant to become intoxicated.

The economical impact of the intoxication to the sheep industry of Rio Grande do Sul is indicated by the geographic distribution of the disease, observed in 3 of the 13 counties which is the area of influence of the Pelotas Regional Diagnostic Laboratory. Besides, the intoxication occurs also in at least another county in the central area of the State (Barros et al. 1970).

The soft tissue changes observed in the present material were closely similar to those described in hypervitaminosis D, both from ingestion of excessive amounts of cholecalciferol (Hass et al. 1958, Capen et al. 1966, Chineme et al. 1976, Simesen et al. 1978) and from intoxication by calcinogenic plants (Carrillo & Worker 1967, Dirksen et al. 1971, Krook et al. 1975a,b, Morris et al. 1979). Two factors seem to be responsible for the soft tissue calcification: 1) the direct toxic effect of the active principle on elastic tissues as it was mentioned in the intoxication by *Solanum malacoxylon* (Barros et al. 1981), *Cestrum diurnum* (Krook et al. 1975a, Simpson & Bruss 1979) and vitamin D (Haschek et al. 1978); and 2) the hypercalcemia as it was mentioned by Wasserman (1978).

In bone tissue, osteopetrosis was constantly observed. A similar lesion was described in intoxication by vitamin D (Storey 1960, Capen et al. 1966, Chineme et al. 1976) and calcinogenic plants (Carrillo 1973, Dirksen et al. 1972, Krook et al. 1975 a,b; Dämmrich et al. 1975). Hypercalcitoninism, induced by the hypercalcemia, and evidenced by the presence of hyperplastic C cells, is obviously causing osteopetrosis through the inhibition of osteoclastic and osteocytic resorption. Calcitonin is a potent inhibitor of osteoclastic resorption and increases mineral deposition in perilacunar bone (Jubb et al. 1985).

Hypoparathyroidism indicated by the histological picture of the parathyroid glands should contribute to the inhibited bone resorption. This hypoparathyroidism is commonly interpreted as a consequence of hypercalcemia. On the other hand, it has been shown in short term experiments with very high dietary cholecalciferol in young pigs that parathyroid atrophy precedes hypercalcemia (Haschek et al. 1978).

The direct effect of the active principle of the plant on bone cells could be also responsible for the osteopetrosis. A clear evidence of this effect on osteocytes is the presence of osteonecrosis, an alteration described also in the intoxication by calcinogenic plants (Santos et al. 1976, Krook et al. 1975a,b) and vitamin D (Chineme et al. 1976).

The presence of wide basophilic lines in the skeleton, similar to the observed in the present material, has been described in the intoxication by *Solanum malacoxylon* (Carrillo 1973, Dämmrich et al. 1975) and vitamin D (Hass et al. 1958, Storey 1960, Stevenson et al. 1976, Simesen et al. 1978), and are probably related to the production of abnormal osteoid tissue by osteoblasts (Hass et al. 1958, Storey 1960). The formation of more than one layer of such basophilic lines probably represents the periodical remissions of the disease.

The lack of differentiation of articular and epiphyseal cartilages, and the presence of transversal trabeculation occurred as a consequence of the effect of NV toxic principle in the cartilage. Similar lesions were described in the intoxication by calcinogenic plants (Santos et al. 1976, Kasali et al. 1976) and vitamin D (Storey 1960, Haschek et al. 1978).

Another evidence of the interference of the intoxication in endochondral ossification was the presence of cartilage trapped in epiphyseal and metaphyseal bone.

The calcinogenic mechanism of some calcinogenic plants has been determined. The toxic principle of *Solanum malacoxylon* and *Cestrum diurnum* is a glycosidic steroid that, after hydrolysis, acts biologically and chromatographically like authentic 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Mass spectrometry by direct probe analysis and gas chromatography mass spectrometry showed that the spectral pattern of these steroids is very similar to the authentic 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Wasserman 1978). In *Trisetum flavescens*, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> like activity has been also detected (Rambeck & Zucker 1982).

Cholecalciferol is first hydroxylated in the liver to form 25(OH)D<sub>3</sub> and further hydroxylation occurs in the kidney which is controlled by a feed back system to form 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Hypercalcemia and low plasma parathormone decrease the formation of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. When the 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is ingested with calcinogenic plants, the feed back system is by passed, as a consequence there is an excessive synthesis of calbindin-D (CaBP) which increases calcium absorption causing an uncontrolled hypercalcemia (Wasserman 1978).

In the present work, the results obtained in experiments I and III demonstrated that NV does act as vitamin D since the addition of the plant to the rachitogenic diet stimulated calcium ( $^{47}\text{Ca}$ ) absorption, uptake of  $^{47}\text{Ca}$  by the tibia, and also increased the amount of CaBP synthesized by the duodenal mucosa, and the calcium and phosphorus plasma levels.

In the strontium experiments, contradictory results were obtained. In experiment II the results showed that the presence of the plant in the diet did not elevate calcium absorption or the uptake of  $^{47}\text{Ca}$  by the tibia. However, there was an increase of CaBP synthesized by the duodenal mucosa of the chicks fed the diet containing NV. These results can be interpreted as indicating

that NV does contain 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-like activity, although not in sufficient amount to stimulate the intestinal absorption of calcium. In contrast, in experiment IV the response of the chicks to a diet containing 10% NV, compared with a diet with 2% *Cestrum diurnum*, showed that NV was unable to overcome the inhibitory effect of the strontium diet, whereas the *Cestrum* plant was able to do so.

At this point, it can be concluded that NV does contain vitamin D-like activity; in one batch of NV the presence of a small quantity of 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> - like substance was demonstrated. The failure to demonstrate its presence in a clear and constant way in the experiments in chicks may be that an insufficient amount of NV was fed.

It has been shown that large doses of NV (116 to 338 g per kg of body weight) are necessary to induce mild to severe calcinosis in sheep (Riet-Correa et al. 1980). *Trisetum flavescens* is another calcinogenic plant which needs to be ingested in large quantities in order to induce calcinosis (Simpson & Bruss 1979), and it was difficult to demonstrate 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> activity in chicks when it was added at 10% in the diet (Wasserman et al. 1977). However, Rambeck and Zucker (1982) were able to demonstrate 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-like substance in an ether extract of the plant. Köhler et al. (1978) and Peterlik et al. (1977) also showed the presence of a 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-like substance in *T. flavescens*. Other possibilities are that the active principle in NV is considerably more labile than the 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-like substance in the *Cestrum* plant or that there is another mechanism involved in the production of calcinosis by NV.

*Acknowledgements.*- We thank Dr. Lauro Nakagawa from the Faculty of Medicine, UFPEl, for the calcium determinations, Miss Emilia Santos and Elza Fromm Trinta from the Botanical Garden in Rio de Janeiro, for the botanical determination of *Nierembergia veitchii* and Dr. R.R. Mirror from Cornell University for the electron microscopy.

## REFERENCES

Arnold R.M. & Bras. G. 1956. Observations on the morbid anatomy and histology of Manchester wasting disease of cattle in Jamaica and related conditions in other countries of Americas. *Am. J. Vet. Res.* 17: 630-639.

Barros S.S., Pohlenz J. & Santiago C. 1970. Zur Kalzinose beim Schaf. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 77: 321-356.

Barros S., Tabone E., Santos M., Andujar M. & Grimaud J.A. 1981. Histological and ultrastructural alterations in the aorta in experimental *Solanum malacoxylon* poisoning. *Virchows Arch. (Cell Path.)* 35: 169-175.

Capen C.H. C., Cole C.R. & Hibbs J.W. 1966. The pathology of hypervitaminosis D in cattle. *Path. Vet.* 3: 350-378.

Carrillo B.J. & Worker N.A. 1967. Enteque seco: arteriosclerosis y calcificación metastásica de origen tóxico en animales a pastoreo. *Revta Investigaciones Agropecuarias INTA, Buenos Aires, Série 4, Patologia Animal*, 4: 9-30.

Carrillo B.J. 1973. Efecto de la intoxicación de *Solanum malacoxylon* en el sistema óseo. *Revta Investigaciones Agropecuarias INTA, Buenos Aires*, 10: 67-77.

Chineme C.N., Krook L. & Pond W.G. 1976. Bone pathology in hypervitaminosis D. An experimental study in young pigs. *Cornell Vet.* 66: 387-412.

Copland J.W. 1975. Enzootic calcinosis, in Papua New Guinea. *Aust. Vet. J.* 51: 326.

Dämmrich K., Döbereiner J., Done S.H. & Tokarnia C.H. 1975. Skeletterveränderungen nach Vergiftungen mit *Solanum malacoxylon* bei Rindern. *Zbl. Vet. Med. A* 22: 313-329.

Dirksen G., Plank P., Dämmrich K. & Hänichen T. 1971. Quadro clínico y anatomopatológico de una calcinosis enzoótica en el bóvido. *Noticias Médico-Veterinarias (Leverkusen)* 3: 203-218.

Dirksen G., Plank P., Hänichen T. & Spiess A. 1972. Über eine enzoötische Kalzinose beim Rind. 5. Experimentelle Untersuchungen in Kaninchen mit selektiver Verfütterung von Knaulgras (*Dactylis glomerata*), Goldhafer (*Trisetum flavescens*) und einem Gräsergemisch. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 79: 73-96.

Döbereiner J., Tokarnia C.H., Costa J.B.D., Campos J.L.E. & Dayrell M.D.S. 1971. "Espichamento", intoxicação de bovinos por *Solanum malacoxylon* no pantanal de Mato Grosso. *Pesq. Agropec. Bras., Ser. Vet.*, 6: 91-117.

Gill E.S., Singh M. & Chopra A.K. 1976. Enzootic calcinosis in sheep: clinical signs and pathology. *Am. J. Vet. Res.* 37: 545-552.

Gimeno E.J. 1977. Sobre las calcinosis generalizadas de los animales domésticos. *Gazeta Veterinaria (Argentina)* 39: 10-17.

Gomori G. 1942. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with photometric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.* 27: 955-960.

Haschek W.M., Krook L., Kallfelz F.A. & Pond W.G. 1978. Vitamin D toxicity. Initial site and mode of action. *Cornell Vet.* 68: 324-364.

Hass G.M., Trueheart R.E., Taylor C.B. & Stumpe M. 1958. An experimental histologic study of hypervitaminosis D. *Am J. Path.* 34: 395-431.

Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. 1985. Pathology of domestic animals. Vol. 3, 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press. New York, p. 138.

Kasali O.B., Krook L., Pond W.G. & Wasserman R.H. 1976. *Cestrum diurnum* intoxication in normal and hyperparathyroid pigs. *Cornell Vet.* 67: 190-221.

Köhler H., Regal D.S. & Peterlik M. 1978. Zur Kalzinose der Rinder in Österreich. VI. Nachweis einer 1,25-Dihydroxycholecalciferol-artigen Substanz als Ursache der antirachitischen Wirkung von Goldhafer (*Trisetum flavescens* bei Kücken und Wachteln. *Zbl. Vet. Med.* 25: 253-270.

Krook L., Wasserman R.H., Shively J.N., Tashjian A.H., Brokken T.D. & Morton J.F. 1975a. Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses: Implication of the shrub *Cestrum diurnum*, as the causative agent. *Cornell Vet.* 65: 26-56.

Krook L., Wasserman R.E., McEntee K., Brokken T.D. & Teigland M.D. 1975b. *Cestrum diurnum* poisoning in Florida cattle. *Cornell Vet.* 65: 557-575.

Lemos R.C. et al. 1973. Levantamento de reconhecimento dos solos do Estado do Rio Grande do Sul. *Bolm Téc. n° 30, Div. Pesq. Pedol., DNPEA, Min. Agricultura, Brasil*, p. 357-361.

Libiseller R., Glawischign E., Köhler H. & Swoboda R. 1976. Zur Kalzinose der Rinder in Österreich. III. Experimentelle Auslösung einer Kalzinose bei Schafen und Kaninchen durch grünen Goldhafer (*Trisetum flavescens*) aus dem Pannonischen Klimagebiet. *Zbl. Vet. Med.* 23a: 1-30.

Luna L.G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill Book Company, New York, p. 258.

Lynd F.T., Willers E.H., Weight L.A. & Gebauer P.W. 1965. Bovine arteriosclerosis in Hawaii. *Am. J. Vet. Res.* 26: 1344-1349.

Morris K.L.M., Simonite J.P., Pullem L. & Simpson S.A. 1979. *Solanum torvum* as a causative agent of enzootic calcinosis in Papua, New Guinea. *Res. Vet. Sci.* 27: 264-266.

Newman F., Nobel T.A. & Klopper U. 1973. Calcinosis in goats. *J. Comp. Path.* 83: 343-350.

Newman F., Nobel T.A. & Bogin E. 1977. Enzootic calcinosis in sheep and C-cell hyperplasia of the thyroid. *Vet. Rec.* 101: 364-366.

Peterlik M., Regal D.S. & Köhler H. 1977. Evidence for a 1,25-dihydroxyvitamin D-like activity in *Trisetum flavescens*: possible cause for calcinosis in grazing animals. *Bioch. Biophys. Res. Commun* 77: 775-781.

Rambeck W.A. & Zucker H. 1982. Vitamin D-artige Aktivitäten in calcinogenen Pflanzen. *Zbl. Vet. Med. A.* 29: 289-296.

Riet-Correa F., Riet-Correa I. & Bellagamba C. 1975. Calcificación metastásica enzoótica (enteque seco) em bovinos del Uruguay. *Veterinaria, Montevideo*, 12: 15-23.

Riet-Correa F., Méndez M.C., Schild A.L., Petiz C.A., Scarsi R. 1980

- Reprodução experimental de calcinose enzoótica em ovinos mediante a administração de *Nierembergia veitchii*. An XVII Congr. Bras. Med. Vet., Fortaleza, p. 105.
- Riet-Correa F., Méndez M.C., Schild A.L., Santos E.C. & Scarsi R. 1981. Experimentos em coelhos sugerem *Nierembergia veitchii* como causa de calcinose enzoótica em ovinos do Rio Grande do Sul. Pesq. Agropec. Bras. 16: 727-732.
- Ross E., Simpson C.F., Rowland L.O. & Harm R.H. 1971. Toxicity of *Solanum sodomaeum* and *Solanum malacoxylon* to chicks. Poultry Sci. 50: 810-813.
- Santos M.N., Nunes V.A., Nunes I.J., Barros S.S., Wasserman R.H. & Krook L. 1976. *Solanum malacoxylon* toxicity. Inhibition of bone resorption. Cornell Vet. 66: 566-589.
- Simesen M.G., Hänichen T. & Dämmrich K. 1978. Hypervitaminosis D in sheep. Acta Vet. Scand. 19: 588-600.
- Simpson Ch. F. & Bruss M.L. 1979. Ectopic calcification in lambs from feeding the plant *Cestrum diurnum*. Calcif. Tissue Int. 29: 245-250.
- Stevenson R.G., Palmer N.C. & Finley G.G. 1976. Hypervitaminosis D in rabbits. Can. Vet. J. 17: 54-57.
- Storey F. 1960. Osteoesclerosis after intermittent administration of large doses of vitamin D in the rat. J. Bone Joint Surg. 42B: 606-625.
- Tustin R.C., Pienaar C.H., Schmidt J.M., Faul A., Vander K., Walt P.A., Boyazoglu P.A. & Boom H.P.A. 1973. Enzoootic calcinosis of sheep in South Africa. J.S. Afr. Vet. Assoc. 44: 383-395.
- Wasserman R.H. 1978. The nature and mechanism of action of the calcinogenic principle of *Solanum malacoxylon* and *Cestrum diurnum* and a comment on *Trisetum flavescens*, p. 545-553. In: Keeler R.F., Van Kampen K.R. & Janes L.F. (ed.) Effects of poisonous plants on livestock. Academic Press, London.
- Wasserman R.H., Corrandino R.A., Krook L., Hughes M.R. & Haussler M.R. 1976. Studies on the 1,25 dihydroxycholecalciferol like activity in a calcinogenic plant *Cestrum diurnum*, in the chick. J. Nutrition 106: 457-465.
- Wasserman R.H., Krook L. & Dirksen G. 1977. Evidence for antirachitic activity in the calcinogenic plant *Trisetum flavescens*. Cornell Vet. 67: 333-350.

# EFEITO DO LEITE MATERNO SOBRE AS LESÕES PERIDENTÁRIAS DA "CARA INCHADA" EM BEZERROS<sup>1</sup>

JÜRGEN DÖBEREINER<sup>2</sup>, IVAN VALADÃO ROSA<sup>3</sup> e ADEMIR A. LAZZARI<sup>4</sup>

**ABSTRACT.**- Döbereiner J. Rosa I.V. & Lazzari A.A. 1987. [Influence of the milk on periodontal lesions of "cara inchada" in calves.] Efeito do leite materno sobre as lesões peridentárias da "cara inchada" em bezerros. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(3): 97-99. Embrapa-UAPNPSA, Km 47, Seropédica, RJ 23851, Brazil.

Five calves of mixed zebu breed, 3 to 4 months old, with active periodontal lesions of "cara inchada" (CI) were confined, during 4 and a half months, to a covered corral on a farm where the disease has been a problem, in the Rondonópolis area of northern Mato Grosso, Brazil. The calves were milk-fed on cows which were kept grazing on *Panicum maximum* pasture known to induce a relatively high prevalence of CI (more than 30 per cent). As roughage the calves received native grass cut daily in a near "cerrado" (savanna) area. On this type of natural pasture the disease has never been observed. The periodontal lesions of the five animals persisted or worsened, and two of them died. These observations, together with data from former studies, suggest that a determining factor of CI may exist also in the milk of cows kept on pastures where the disease occurs.

**INDEX TERMS:** Cara inchada, periodontal disease, periodontitis, cattle, calves, milk.

**SINOPSE.**- Cinco bezerros, mestiços zebu, de 3 e 4 meses de idade, com lesões peridentárias ativas da "cara inchada" (CI), foram confinados num curral de fazenda com o problema da doença, na região de Rondonópolis, Mato Grosso, durante 4 meses e meio. Os bezerros foram amamentados pelas respectivas mães mantidas em pastos com prevalência relativamente alta de CI (mais que 30%), as quais eram levadas ao curral duas vezes ao dia; como volumoso os bezerros receberam, no cocho, capim nativo recentemente cortado em área sob vegetação de cerrado, dentro da própria fazenda. A CI nunca foi observada em bezerros criados neste tipo de pastagem. As lesões peridentárias destes bezerros persistiram ou se agravaram e dois dos animais morreram. Estas observações, em conjunto com os dados obtidos em outros estudos anteriores, sugerem que o fator determinante da CI existia também no leite de vacas mantidas em pasto positivo para a doença.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Cara inchada, doença peridentária, periodontite, bovinos, bezerros, leite.

## INTRODUÇÃO

A "cara inchada" dos bovinos (CI) é uma doença peridentária de etiologia ainda não esclarecida, que afeta bezerros em certas áreas de pastos recém-formados nas regiões Norte, Centro-

Oeste e Sudeste do Brasil, podendo atingir mais de 50% dos animais jovens de um rebanho (Döbereiner et al. 1974). A transferência de bovinos doentes, de áreas positivas para CI à região indene, com pastagem natural de cerrado, resultou em regressão e cura das lesões peridentárias em período de 5 a 6 meses (Döbereiner et al. 1975). Por outro lado, bezerros desmamados afetados pela doença também se recuperaram quando confinados em fazendas positivas para CI e alimentados com ração balanceada produzida com ingredientes de outra região (Rosa et al. 1976). A doença persistiu em bezerros desmamados mantidos em pastagens exclusivas de *Panicum maximum*, onde todas as outras plantas foram eliminadas (Döbereiner et al. 1976), e sabe-se hoje que a CI incide também em bovinos mantidos em pastos formados com outras espécies forrageiras, tais como *Hyparrhenia rufa*, *Brachiaria decumbens* e *B. humidicola*. Dois experimentos com suplemento mineral considerado completo, realizados em duas propriedades de alta prevalência da doença (50 a 65%), não demonstraram a eficácia da mistura em reduzir o número de casos de CI nos bezerros (Souza 1984), resultados estes que contrariam a hipótese de que uma deficiência ou um desequilíbrio mineral seriam a causa primária da CI.

Trabalhos de isolamento bacteriológico a partir de materiais obtidos das lesões peridentárias, demonstraram a presença de *Bacteroides melaninogenicus* e *Actinomyces pyogenes* e, menos frequentemente, *B. bivius*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus israelii* (Blobel et al. 1984). Um estudo das atividades enzimáticas e endotóxicas desses microrganismos, revelou a presença de enzimas e endotoxinas com potencial para destruição tissular, o que sugere a participação de bactérias no desenvolvimento das lesões peridentárias da CI (Dutra et al. 1986).

As lesões peridentárias já podem ser observadas em bezerros a partir de 1 mês de idade, fase da vida em que o leite materno representa a principal fonte alimentar do animal. Destarte,

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 3 de maio de 1987.

Apresentado no XVI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Salvador, Bahia, 22-27.10.78.

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

<sup>3</sup> Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Embrapa, Cx. Postal 154, Campo Grande, Mato Grosso do Sul 79100.

<sup>4</sup> Embrater, R. Dionizio Rozendo 155, Vitória, Espírito Santo 29000; antigamente Emater-MT em Rondonópolis.

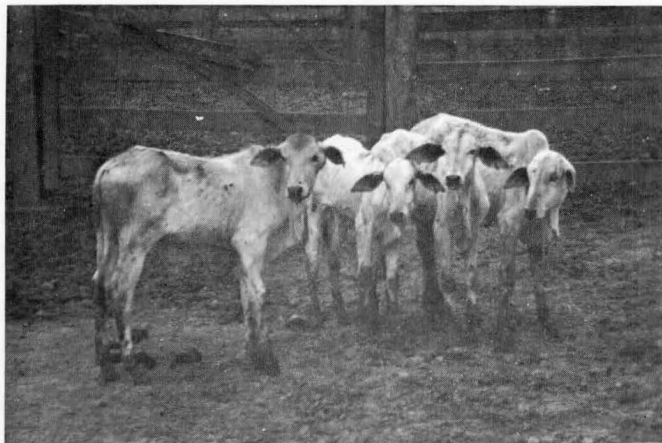


Fig. 1. Bezerros com "cara inchada" do lote A confinados, por ocasião do 2º exame clínico 3 meses e meio após o início do experimento, alimentados com leite das vacas mães mantidas em pasto da fazenda com o problema da doença e com capim nativo do cerrado.



Fig. 2. Bezerros do lote A, sendo amamentados pelas vacas trazidas duas vezes por dia do pasto onde havia alta prevalência de "cara inchada" nos últimos anos.

admite-se que o leite materno também possa encerrar um fator que ingerido pela vaca através das forrageiras da pastagem, favoreceria, direta ou indiretamente, o desenvolvimento e a ação das bactérias patogênicas isoladas do processo peridentário. O presente experimento foi conduzido com a finalidade de adicionalmente evidências quanto a existência de tal fator determinante e sua presença no leite de vacas com bezerros afetados pela CI.

MATERIAL E MÉTODOS

Nove bezerros portadores de lesões peridentárias de CI, com idade de 3 a 4 meses, foram distribuídos em dois lotes (A e B) o mais uniformemente possível em relação à gravidade das lesões peridentárias, sendo individualmente identificados com brinco numerado na orelha. A partir de 5.11.76 os 5 bezerros do lote A foram confinados na Fazenda Pc, município de Rondonópolis, Mato Grosso, enquanto suas mães permaneciam em pastagem de capim-colômbio (*Panicum maximum* Jacq) em área próxima ao curral, onde a prevalência da doença sempre, desde a formação dos pastos, foi relativamente alta (mais que 30%). Duas vezes ao dia as vacas eram trazidas ao curral para aleitar os bezerros que recebiam ainda, à vontade no cocho, capim nativo picado colhido em área de cerrado natural da fazenda, indene para CI. O lote B de 4 bezerros com 4 meses de idade, foi mantido, junta-

Quadro 1. Lesões peridentárias da "cara inchada" (CI) observadas nos bezerros confinados (lote A) durante o período de 5.11.76 a 22.3.77, na Fazenda Pc, mun. Rondonópolis, Mato Grosso

Bovino nº	Sexo	Idade	Estado ao 1º exame clínico em 5.11.76				Estado ao 2º exame clínico em 25.1.77				Estado ao 3º (último) exame clínico em 22.3.77				Interpretação em relação à evolução das lesões peridentárias da "cara inchada"							
			Estado de Abaulamento da região maxilar		Lesões peridentárias maxilares		Estado de nutrição		Lesões de miase ao redor dos dentes incisivos		Abaulamento da região maxilar		Lesões peridentárias maxilares			Lesões de miase ao redor dos dentes incisivos						
			Direto moderado	Bilateral leve	P <sub>2-3</sub> ++(2)	Ausentes	Lado direito	Lado esquerdo	Regular a mau	Regular	Ausente	Lado direito	Lado esquerdo	Lado direito		Lado esquerdo	Lado direito	Lado esquerdo				
3832	f	3 meses	Mau	Direto moderado	P <sub>2-3</sub> ++(2)	Ausentes	Regular a mau	Bilateral accentuado	P <sub>1</sub> P <sub>2</sub> P <sub>3</sub> ++	P <sub>3</sub> +++	P <sub>2</sub> faltam	Lado direito	Lado esquerdo	P <sub>1</sub> P <sub>2</sub> P <sub>3</sub> faltam + M <sub>1</sub> +	P <sub>1</sub> P <sub>2</sub> P <sub>3</sub> frouxos, P <sub>2</sub> falta+++	M <sub>1</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	+++	+++	+++	Agravadas
3833	m	3 meses	Mau	Bilateral leve	P <sub>2-3</sub> ++	P <sub>2-3</sub> +	Regular	Bilateral moderado	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	Lado direito	Lado esquerdo	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	+++	+++	+++	Persistentes	
3834	f	3 meses	Regular	Esquerdo leve	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	Regular	Bilateral accentuado	P <sub>2</sub> frouxo	P <sub>2</sub> frouxo	P <sub>2</sub> frouxo	Lado direito	Lado esquerdo	P <sub>2</sub> frouxo	P <sub>2</sub> frouxo	P <sub>2</sub> frouxo	P <sub>2</sub> frouxo	+++	+++	+++	Agravadas	
3835	m	3 meses	Regular	Ausente	P <sub>2-3</sub> +	Ausentes	Regular a mau	Bilateral moderado	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	Lado direito	Lado esquerdo	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	+++	+++	+++	Agravadas	
3836	f	4 meses	(Animal afetado pela CI, não examinado)				Regular	Bilateral accentuado	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	P <sub>2-3</sub> +	Lado direito	Lado esquerdo	P <sub>1</sub> frouxo	P <sub>2</sub> falta	P <sub>3</sub> +++	P <sub>1</sub> P <sub>2</sub> faltam + P <sub>3</sub> +++	+++	+++	+++	Persistentes ou agravadas	

(a) A(s) cruz(es) ao lado da indicação das lesões significat(m) existência de processo peridentário ativo: +++ lesão accentuada, ++ lesão moderada, + lesão leve, (+) lesão discreta.

mente com suas mães, no mesmo pasto em que ficaram as vacas mães dos bezerros estabulados (lote A). Além do exame inicial, os bezerros deste lote foram reexaminados duas vezes (em 25.1.77 e 22.3.77), após 2 meses e meio e 4 meses e meio do início do experimento, respectivamente, com a finalidade de avaliar o comportamento, i.e. agravamento, persistência ou regressão e cura das lesões peridentárias (Fig. 1 e 2).

### RESULTADOS

Os exames da cavidade oral dos 5 bezerros com CI confinados (lote A), recebendo aleitamento das mães duas vezes ao dia mais capim nativo do cerrado no cocho, mostraram agravamento ou persistência das lesões peridentárias observadas inicialmente, sendo que 2 animais do lote morreram após aproximadamente 3 meses e meio de experimentação (Quadro 1). Os 4 bezerros com CI do lote B, mantidos juntamente com suas mães em pastagem de capim-colônião, próximo ao curral, morreram entre aproximadamente 1 mês e meio e 3 meses do início do experimento.

### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A ausência de indícios de regressão ou cura (reparação) das lesões peridentárias da CI nos 5 bezerros do Lote A, mantidos confinados no curral e sendo aleitados duas vezes ao dia pelas mães, que permaneciam em pasto de alta ocorrência da doença, sugere a existência, no leite, de um fator determinante da doença, corroborando a suspeita anterior, estabelecida a partir de históricos da doença e de observações anatomo-clínicas (Döbereiner et al. 1974). Naquele trabalho, em que foram também examinados numerosos bezerros de poucos dias a algumas semanas de idade, foram observadas lesões peridentárias da CI em animais a partir de aproximadamente 1 mês de idade, quando os segundos e terceiros premolares maxilares (P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub> max.)<sup>5</sup> já tinham irrompido a mucosa gengival e a alimentação do animal consistia ainda, em grande parte, de leite.

A morte dos bezerros do lote B, antes do término do experimento, poderia ser explicada pelo fato de que aqueles animais, além de estarem sujeitos ao "fator determinante" da CI, possivelmente existente na pastagem (Döbereiner et al. 1976), se encontravam em condições ambientais mais adversas do que as dos animais do lote A, do qual morreram apenas 2 animais. O lote B foi incluído no experimento como grupo de controle para o caso de haver regressão e cura das lesões peridentárias dos bezerros confinados (lote A).

<sup>5</sup> Filogenicamente denominados de Pd<sub>3</sub> e Pd<sub>4</sub> maxilares, porém, por razões de ordem prática, mantém-se a abreviação P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub> max., usada nos trabalhos publicados anteriormente.

Embora a água de bebida de ambos os lotes tivesse origens diferentes, (córrego ou açude para o lote B e bebedouro para o lote A) a hipótese de que a água pudesse de algum modo contribuir para impedir a recuperação das lesões peridentárias nos animais confinados foi descartada com base nos resultados de um experimento anterior (Rosa et al. 1976) em que animais confinados no mesmo local e bebendo a água do bebedouro se recuperaram das lesões peridentárias, com o emprego de ração balanceada. Por outro lado, dados de levantamentos de históricos, em fazendas e de estudo experimental anterior, em que se obtém a reparação das lesões peridentárias quando bovinos afetados pela CI permaneceram em região de pastagem nativa do cerrado durante 4 a 6 meses (Döbereiner et al. 1975), indicam que as forrageiras da vegetação natural de cerrado não encerram o suposto fator determinante da doença. Portanto, o capim nativo colhido no cerrado e dado aos bezerros do lote A não estaria influenciando a permanência ou exacerbação das lesões peridentárias desses animais. Descartadas as possibilidades de interferência de tais fatores, parece restar apenas o leite das mães, mantidas em pasto positivo para CI, como razão mais provável da persistência e agravamento das lesões peridentárias no presente estudo experimental.

*Agradecimentos.* - Os autores agradecem ao Sr. Antonio Luis de Castro, proprietário da fazenda onde foi realizado o experimento, por sua colaboração cedendo aniamis e área para o trabalho, e à Secretaria de Agricultura do Estado de Mato Grosso e à EMATER pelo apoio dado durante a execução do mesmo.

### REFERÊNCIAS

- Blobel H., Döbereiner J., Lim F.G.F. & Rosa I.V. 1984. Bacterial isolations from "Cara inchada" - lesions of cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 4(2): 73-77.
- Döbereiner J., Chaves J.A., Rosa I.V. & Houser R.H. 1975. Efeito da transferência de bovinos com "cara inchada" (doença peridentária) para pastos de região indene. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.*, 10:99-103.
- Döbereiner J., Inada T. & Tokarnia C.H. 1974. "Cara inchada", doença peridentária em bovinos. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.*, 9:63-85.
- Döbereiner J., Rosa I.V. & Lazzari A.A. 1976 "Cara inchada" (doença peridentária) em bezerros mantidos em pastos de *Panicum maximum*. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.* 11:43-47.
- Dutra I.S., Kanoe M. & Blobel H. 1986. Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 6(2):59-63.
- Rosa I.V., Carvalho J.C., Houser R.H. & Döbereiner J. 1976. Influência de ração balanceada sobre a "cara inchada" (doença peridentária) de bezerros. *Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet.* 11:59-63.
- Souza J.C. 1984. Comunicação pessoal (Embrapa-CNPGC, Campo Grande, MS).