

ISSN 0100-736X

Volume 3 Número 4
Out/Dez 1983

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. Como complemento traz resumos de trabalhos de ciências veterinárias publicados, recentemente no Brasil. Os autores devem fazer com que seus trabalhos, quando a ela destinados, sejam datilografados de acordo com as instruções publicadas na própria revista.

Editorial Policy

Pesquisa Veterinária Brasileira, a bilingual quarterly journal, edited by the Brazilian College of Animal Pathology, publishes original articles and review papers on all aspects of veterinary science. Contributions on animal pathology and related subjects, mainly diseases of economic importance, are particularly welcomed. Reviews should be written in support of original investigations. The editors assume that papers submitted are not being considered for publication in other journals and do not contain material which has already been published.

Corpo Editorial (Editorial Board)

Editor: Jürgens Döbereiner. **Editores Assistentes:** Oswaldo Duarte Gonçalves, Cheryl Ann Rowe, Fernando Cordeiro. **Editores Adjuntos:** Severo Sales de Barros, Osmane Hipólito, Jerome Langenegger, Hugo Barboza de Rezende, Adayr Mafuz Saliba, Jefferson Andrade dos Santos, Carlos Hubinger Tokarnia.

Assessoria Científica (Advisory Board)

Carlos Cypriano P. Arteché, Eduardo H. Birgel, Hans Blobel, Pedro Gonçalves Cabral, A.F. Pestana de Castro, Milton de Souza Dayrell, Gerrit Dirksen, Laerte Grisi, Eberhard Grunert, Jorge Almeida Guimarães, Gerhard Habermehl, Ernesto Hofer, Michael R. Honer, Mario Mariano, Anton Mayr, Francisco Megale, Hans Merkt, Gonzalo E. Moya, Ronaldo Reis, Carlos H. Romero, Ivan B. Machado Sampaio, Hermann G. Schatzmayr, L.-Cl. Schulz.

O Colégio Brasileiro de Patologia Animal, inicialmente, está recebendo um auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para editar a revista que, gradativamente, deve tornar-se financeiramente independente através de publicidade e assinaturas.

Interessados na colocação de anúncios na revista queiram se dirigir à firma Armando Amorim Publicidade, Av. Presidente Vargas 590, grupos 2105/06/14, Rio de Janeiro, RJ 20074 (tel. 263-1024 e 263-1923).
Diretoria: Armando M. Amorim. Supervisão: Almir Tardin.

Aos interessados em receber a revista solicitamos preencher o cupom de assinatura inserido neste exemplar, seguindo as instruções contidas no mesmo (*For subscription complete the form enclosed in this issue and follow instructions*).

A correspondência referente à publicação de trabalhos e a outros assuntos técnicos-científicos editoriais deve ser endereçada ao (*All editorial communications, including typescripts, should be addressed to*): Dr. Jürgen Döbereiner, Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, Embrapa, Km 47, 23460 Seropédica, Rio de Janeiro (Brazil), tel. (021) 788-1324.

Este número é publicado com o apoio do CNPq-Finep e da Embrapa.

Figura da capa: Dentes incisivos de bovino do estabelecimento H. O grau de lesão de cada dente foi: 4-3-4-3-3-4-3-3. (Reit-Correa et al.: Poluição Industrial como causa de Intoxicação por Flúor em Bovinos no Município de Rio Grande, RS, p. 107).

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

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

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

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

v. trim. ISSN 0100-736X

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

CDD 636.089

CDU 619:616(81)(05)

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

— uma revista do Colégio Brasileiro de Patologia Animal

A Brazilian Journal of Veterinary Research, published by the Brazilian College of Animal Pathology

Volume 3

Outubro/Dezembro 1983

Número 4

SUMÁRIO

Transferência de embriões em bovinos pelos métodos cirúrgico e não cirúrgico. <i>M.I.B. Rubin, C.P.D. Costa, C.S. Pinto, J.L. Rodrigues, R.M. Gregory, J. Hahn & A.M. Silva</i> . . .	103-106
Poluição industrial como causa da intoxicação por flúor em bovinos no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul. <i>F. Riet-Correa, J.A. Oliveira, M.D.C. Mendez & A.L. Schild</i> .	107-114
Intoxicação experimental por <i>Crotalaria anagyroides</i> (Leg. Papilionoideae) em bovinos. <i>C.J. Tokarnia & J. Döbereiner</i>	115-123
Prevalência do vírus da leucose enzoótica bovina no rebanho leiteiro do Paraná. <i>C.E. Kantek, E.R. Kruger & V.R. Welte</i>	125-129
Patogenicidade de uma cepa do vírus herpes da doença de Marek. <i>L.F.C.G. Vianna & C.H. Romero</i>	131-139
Resumos 55-82	141-146

CONTENTS

Surgical and non-surgical embryo transfer in cattle. <i>M.I.B. Rubin, C.P.D. Costa, C.S. Pinto, J.L. Rodrigues, R.M. Gregory, J. Hahn & C.A.M. Silva</i>	103-106
Industrial pollution as a cause of fluoride intoxication in cattle in the municipality of Rio Grande, southern Brazil. <i>F. Riet-Correa, J.A. Oliveira, M.D.C. Méndez & A.L. Schild</i> .	107-114
Experimental poisoning of cattle by <i>Crotalaria anagyroides</i> (Leg. Papilionoideae). <i>C.H. Tokarnia & J. Döbereiner</i>	115-123
Prevalence of enzootic bovine leukosis virus in dairy cattle in Parana. <i>C.E. Kantek, E.R. Kruger & V.R. Welte</i>	125-129
Pathogenicity of a strain of Marek's disease herpes virus. <i>L.F.C.G. Vianna & C.H. Romero</i> . .	131-139
Abstract of current Brazilian veterinary science literature (in Portuguese)	141-146

ISSN 0100-736X

Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro, v. 3, n. 4, p. 103-146, out./dez. 1983

III Congresso Mundial de Cunicultura, Roma, Itália, 4-8.4.84

(Secretaria: Associazione Nazionale Coniglicultori Italiani, Via A. Torlonia 19, fone 06-854903, Roma, Itália 00161)

XIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Belém, Pará, 9-13.7.1984

**(Diretoria Executiva: Dr. Fernando Antonio Lobato Tavares (Presidente), Av. Almirante Barros 1234,
Belém, PA 66000; fones (091) 226-1341, 226-8805)**

13º Congresso Mundial de Buiatria (Doenças dos Bovinos e Ovinos) e Programa Satélite para Pequenos Animais, Johannesburg, África do Sul, 17-21.9.1984

(Informações: South African Airways - Sr. Sílvio Carlos Croce, Av. São Luiz 112, 11º and., cj. 1101. fone 257-2914, São Paulo, SP 01046)

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 literature.)

DOENÇAS INFECCIOSAS

55. Mohrdieck B.W., Prado J.A.P., Petzhold S.A. & Reckziegel P.E. 1980. **Ação viricida do Iodophor em febre aftosa.** [The viricid action of Iodophor in FMD.] *Bolm Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre*, 7:9-12. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS 90000.

Neste experimento verificou-se a ação viricida do Iodophor, contido em um produto comercial, sobre o vírus da Febre Aftosa. As concentrações do produto variaram de 5 a 5% observando-se a partir de 1% uma redução de título infeccioso de $10^{4.0}$ DL50/ml (índice mínimo exigido). Entretanto sugere-se sua utilização na concentração de 2% onde se obteve a inativação completa das amostras testadas.

56. Petzhold S.A., Reckziegel P.E., Prado J.A.P., Darsie G.C., Vieira J.D.L. & Teixeira J.C. 1980. **Observação da imunogenicidade e do relacionamento entre amostras de vírus "O" incidentes no campo e a utilizada na fabricação da vacina antiaftosa.** [Studies on the immunogenicity and relationship of FMD virus strains type O recovered from outbreaks and those routinely used in FMD vaccine production.] *Bolm Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre*, 7:13-18. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS 90000.

Estudos sorológicos e imunológicos foram realizados para estabelecer o relacionamento entre amostras de campo do vírus da Febre Aftosa tipo "O" incidentes no RS em 1979 e 1980 e a utilizada na produção de vacinas (Oi-Campos/55). Os testes demonstraram alto grau de relacionamento entre o vírus O-RS/79, isolado a campo, e a amostra vacinal. A amostra vacinal quando comparada com a amostra O-RS/80 isolada do campo em 1980 revelou diferença sorológica mas não imunogênica ($\alpha = 0.05$).

57. Martins R.M. & Petzhold S.A. 1980. **Efeitos de Cloridrato de Tetramisole e do 0,0-dimetil-oxi-2,2,2-tricloroetil na imunogenicidade da vacina antiaftosa.** [The effect of the chloridrate of tetramisole and the 0,0-dimethyl-oxi-2,2,2-tricloroethyl in the immunogenicity of foot-and-mouth disease vaccine.] *Bolm Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre*, 7:19-26. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS 90000.

A imunogenicidade de vacinas contra a Febre Aftosa foi aferida em cobaios que simultaneamente a esta vacinação, foram tratados com vermífugos injetáveis. As drogas usadas

foram o Cloridrato de Tetramisole e 0,0-dimetil-oxi-2,2,2-tricloroetil. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na proteção contra a Febre Aftosa entre os animais vacinados que receberam ou não tratamentos com vermífugos mencionados.

58. Oliveira S.J., Pianta C. & Sityá J. 1980. **Abortos em suínos causados por Leptospira pomona no Rio Grande do Sul, Brasil.** [Infection by Leptospira pomona in sows and abortion in Rio Grande do Sul, Brazil.] *Bolm Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre*, 7:47-49. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS 90000.

Abortos e natimortos ocorreram em suínos de uma granja no Rio Grande do Sul. Porcas de 24 a 36 meses de idade abortaram 12 a 15 dias antes de completarem a gestação. Alguns leitões nasceram debilitados, morrendo poucas horas após. Foi isolada *Leptospira pomona*, de um feto 3 dias após a remessa ao Laboratório. Exames sorológicos nas porcas apresentaram títulos aglutinantes elevados para aquele sorotipo.

59. Oliveira S.J., Pianta C., Gomes M. & Santiago C. 1980. **Abortos em bovinos no Rio Grande do Sul, Brasil. Isolamento de leptospiros do sorogrupo Hebdomadis.** [Abortions in a bovine herd in Rio Grande do Sul, Brazil, caused by leptospira of the Hebdomadis serogroup.] *Bolm Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre*, 7:51-56. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS 90000.

Em um lote de 56 animais em gestação, de uma cabanha de criação de reprodutores da raça charolesa, no Rio G. do Sul, ocorreram 18 abortos entre 4 e 8 meses, além de alguns natimortos e fetos mumificados, durante o período compreendido entre abril de 1980 e fevereiro de 1981. Exames clínicos, testes sorológicos e cultura direta revelaram infecção por *Leptospira sp.*, pertencente ao sorogrupo Hebdomadis. O isolamento de leptospiros do sangue de bovino é relatado pela primeira vez no Brasil.

60. Pianta C. & Fallavena L.C.B. 1980. **Mastite bovina: comportamento do Staphylococcus aureus frente a antibióticos usados em regiões do Estado do Rio Grande do Sul.** [Bovine mastitis: performance of Staphylococcus aureus in antimicrobial sensitivity tests with antibiotics in current use in Rio Grande do Sul, Brazil.] *Bolm Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre*, 7:67-72. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS 90000.

No período de março de 1977 a outubro de 1981 foram examinadas 790 amostras de leite provenientes de vacas com mastite, de diversas regiões do RS, visando isolamento e identificação de agentes bacterianos. O *Staphylococcus aureus* foi isolado em 243 amostras, (74%) de um total 329 lactoculturas positivas. Testes de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos realizados com amostras de *S. aureus* isoladas revelam que 54% eram resistentes à penicilina, 39,5% resistentes à tetraciclina e 28% à estreptomicina. O fato de apenas 329 exames serem positivos, entre 790 amostras estudadas, indica a necessidade de estudos no diagnóstico de mastites desencadeadas por outras causas.

61. Piccinini R.S., Jorge M.A., Cavalcanti R.J.G., Tabosa A.G. & Curvelo V.T. 1982. **O uso da Difenadiona (2-difenilacetil-1,3 indandiona) para o controle de vampiros em áreas endêmicas de raiva, Nordeste do Brasil.** [Use of Diphenadione (2-diphenylacetyl-1,3 indandione) for vampire bat control in endemic rabies areas in Northeastern Brazil.] *Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte*, 34(2): 289-302. Centro Nac. Pesq. Gado de Leite, Embrapa, Cx. Postal 151, Coronel Pacheco, MG-36155.

O controle de vampiros, com o emprego do anticoagulante Difenadiona (2-difenilacetil-1,3 indandiona), foi executado em áreas endêmicas de raiva, nos estados de Pernambuco e Alagoas. Os resultados indicam que o número estimado de vampiros existentes na área foi reduzido em 99,4%, dois anos após início do controle. O tratamento sistêmico do gado foi o melhor método testado, mas sua combinação com o tratamento tópico nos vampiros foi um pouco mais eficiente. Os casos de raiva nos animais diminuíram significativamente nos dois anos seguintes ao controle. Um modelo de regressão foi usado com a finalidade de prever o número de vampiros a serem capturados em uma dada fazenda, sendo apresentado como uma técnica auxiliar aos métodos de controle. O tratamento tópico de mordeduras fescas em bezerros em aleitamento e em vacas próximas à parição foi usado como uma opção e com bons resultados.

62. Lyra T.M.P., Reis R. & Silva I.J. 1982. **Patogenicidade residual de vacinas contra peste suína clássica (cristal violeta e amostra chinesa) em porcas gestantes.** [Safety tests of vaccines, cristal violet and chinese strain, against hog cholera, in pregnant sows.] *Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte*, 34(2): 303-311. Secretaria de Defesa Sanitária Animal, Min. Agric., Brasília, DF 70000.

Cinquenta porcas gestantes foram divididas em três grupos: A) Vinte porcas foram vacinadas aos 45-60 dias de gestação, sendo 10 com vacina cristal violeta e 10 com amostra chinesa; B) Vinte porcas foram vacinadas aos 70-90 dias de gestação, sendo 10 com cristal violeta e 10 com vacina amostra chinesa; C) Dez porcas foram deixadas como controle, não vacinadas. As ocorrências de natimorto, mumificação fetal e mioclonia congênita foram registradas nas leitegadas de todos os três grupos. A leitegada do subgrupo vacinado com cristal violeta, aos 45-60 dias de gestação, apresentou um total de 16,23% de

alterações (natimorto 8,13%, mumificação 4,65% e mioclonia congênita 3,45%). A leitegada do subgrupo vacinado aos 45-60 dias de gestação com amostra chinesa apresentou 6,74% de alterações (natimorto 5,62%, mumificação 1,12% e mioclonia congênita 0,0%). Estas diferenças foram consideradas estatisticamente significativas. Não se observaram diferenças entre os dois grupos vacinados aos 70-90 dias de gestação e o grupo controle.

63. Cunha R.G., Passos W.S., Pagano M.C.C. & Zamborlini L.C. 1982. **Influenza equina-comparação antigênica de vacinas inativadas pelo acetil-etileno-imina, Betapropiolactona e formol.** [Equine influenza antigenic comparison of inactivated vaccines using acetyleneimine, betapropiolactone and formalin.] *Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte*, 34(2): 313-334. Depto Patologia e Clínica Veterinária, Univ. Fed. Fluminense, Rua Vital Brasil Filho 64, Niterói, RJ 24230.

Líquido alantoideo de ovos embrionados infectado com o vírus de influenza A/Equi 1/RJ (Heq 1 Neq 1) foi concentrado por adsorção em hemácias de galinha e posterior eluição. Com três eluidos foram preparadas três vacinas, utilizando-se como inativantes o AEI, a BPL e o formol. Títulos HA e infecciosos dos eluidos foram determinados, antes da inativação. A antigenicidade das três vacinas foi comparada mediante sua inoculação em galos e posterior exame dos soros, pela prova de inibição de hemoaglutinação (IHA). Cada vacina foi injetada sem diluir e nas diluições 1:3,33 e 1:10, três galos para cada diluição. A análise estatística dos títulos de inibição dos soros dos galos vacinados mostrou que a vacina com AEI foi a menos eficiente; na diluição de 1:10 apenas um dos três galos apresentou anticorpos inibidores. Comparando-se as vacinas BPL e formol, registrou-se que a BPL induziu melhores títulos nas concentrações sem diluir e diluída a 1:10; a vacina com formol foi ligeiramente superior na diluição 1:3,33. No cômputo geral dos títulos IHA, a melhor média foi obtida com a vacina BPL, seguindo-se formol e AEI. Não se observou diferenças significativas nos resultados dos exames dos soros entre a primeira e a segunda sangria. Das três vacinas, a BPL foi a que demonstrou menores títulos HA e infeccioso, embora produzisse anticorpos em nível mais alto. Este fato poderia ser explicado por uma menor alteração protéica ocasionada pela BPL e, conseqüentemente, melhor antigenicidade.

64. Cunha Netto S.J., Brant P.C. & Pessoa G.V.A. 1982. **Sorotipos de Salmonella isolados de concentrado, cama e carcaças de frangos de corte em duas granjas em Goiânia, Goiás 1974.** [Prevalence of Salmonella in concentrate, litter and poultry carcasses in two Brazilian farms, Goiânia 1974.] *Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte*, 34(2): 337-344. Esc. Agronomia e Veterinária, Univ. Fed. Goiás, Cx. Postal 697, Goiânia, Goiás 74000.

Sorotipos de *Salmonella* foram pesquisados em amostras de concentrado, cama de galinheiro e carcaças de frangos em duas granjas avícolas. Houve similaridade qualitativa entre os sorotipos de uma mesma granja. Os sorotipos de *Salmonella* identificados nas amostras da Granja A foram *S. anatum*, *S. typhimurium* var. *copenhagen*, *S. enteritides* e *S. typhimu-*

rium. A prevalência de *Salmonella* em carcaças dos frangos produzidos na mesma granja foi de 23,3%. Na granja B, os sorotipos identificados foram *S. oranienburg*, *S. haardt*, *S. typhimurium* e *S. anatum* e a prevalência de *Salmonella* nas carcaças dos frangos produzidos foi de 16,7%. Nas 300 carcaças estudadas nas duas granjas (A e B) observou-se uma prevalência global de 20,0% para *Salmonella*. Os sorotipos *S. anatum* e *S. typhimurium*, muito frequentes nos isolamentos das amostras estudadas, são comumente relacionados como causadores de infecções no homem.

65. Oliveira P.R., Moreira E.C. & Silva J.A. 1982. **Presença do antígeno VIA (Virus Infection Associated) em bovinos vacinados, não vacinados e convalescentes de febre aftosa.** [Presence of the VIA antigen in vaccinated and not vaccinated cattle and livestock in recuperation from foot-and-mouth disease.] *Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte*, 34(3): 501-507. Esc. Vet., Univ. Fed. Minas Gerais, Cx. Postal 567, Belo Horizonte, MG 30000.

Através das provas da dupla difusão em ágar-gel (DDA) e soro-neutralização (SN), foram testados contra o antígeno associado à infecção VIA, 332 bovinos de rebanho livre de febre aftosa e sem histórico de vacinação; 561 animais de rebanho livre de febre aftosa, vacinado de quatro em quatro meses e 104 bovinos convalescentes de febre aftosa, divididos em grupos de dois, seis e 12 meses após a doença. Os bovinos de rebanho livre apresentaram-se negativos ao VIA e à soro-neutralização. Os bovinos de rebanho vacinado e livre apresentaram positividade de 20,0% ao VIA enquanto os bovinos menores de 12 meses não vacinados ou que receberam apenas uma dose de vacina, pertencentes a este mesmo grupo, foram negativos. Os bovinos convalescentes com dois, seis e 12 meses após a doença, apresentaram positividade de 93,3, 86,4 e 50,0%, respectivamente, ao VIA.

66. Faria J.E., Figueiredo J.B. & Santos J.L. 1982. **Frequência de patógenos e desinfecção de mãos de ordenhadores.** [Frequency of pathogens and disinfection of milkers' hands.] *Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte*, 34(3): 515-521. Depto Vet., Univ. Fed. Viçosa, Viçosa, MG 36570.

O estudo da contaminação bacteriana de mãos de ordenhadores revelou a presença de microrganismos considerados patogênicos para a glândula mamária nas mãos de todos ordenhadores, examinadas antes da ordenha e sem prévio tratamento, indicando a possibilidade de veiculação de patógenos para a glândula mamária. Por ordem de eficiência, a clorhexidina, salina com sabão e iodoform foram capazes de reduzir o número total de bactérias sobre as mãos dos ordenhadores.

DOENÇAS PARASITÁRIAS

67. Bacalhau A.S. 1981. **Ocorrência da tricomoníase em bovinos da bacia leiteira de Campina Grande do Estado da Paraíba.** [Occurrence of trichomoniasis in cattle in the Campina Grande dairy basin, Paraíba Brazil.] *Revta Bras. Reprod. Animal* 5(1-2): 21-24. Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – EMEPA, João Pessoa, PB 58000.

Foram examinados 74 touros com idades entre um a 11 anos, pertencentes a 20 propriedades localizadas na bacia leiteira do município de Campina Grande, no Estado da Paraíba, observando-se um índice de 27% (20 animais) de positividade para *Tritrichomonas foetus*. Nos animais com idade entre um a três anos a ocorrência foi 9,5%, percentagem que alcançou 55,5% nos animais mais velhos. Os reprodutores de raças indianas apresentaram uma taxa de incidência de 33,3% e os de raças européias 18,75%. Dos resultados concluiu-se que a ocorrência da tricomoníase na bacia leiteira de Campina Grande é alta, os animais com idade inferior a três anos são atingidos pela doença e os touros de raças indianas são mais susceptíveis à infecção.

68. Viana F.C., Silva J.A., Moreira E.C., Villela L.G., Mendes J.G. & Dias T.O. 1982. **Vacinação contra brucelose bovina com dose reduzida (amostra B₁₉) por via conjuntival.** [Vaccination against bovine brucellosis with reduced dose (strain B₁₉) by conjunctival route.] *Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte*, 34(2): 279-287. Depto Med. Vet. Preventiva, Esc. Vet., Univ. Fed. Minas Gerais, Cx. Postal 567, Belo Horizonte, MG 30000.

A vacinação contra brucelose, com subdosagem de B₁₉ (4,5 x 10⁹), via conjuntival, em duas aplicações, com intervalo de 2 meses, em 78 vacas de rebanho cronicamente infectado (retiro 1) e, com intervalo de 4 meses, em vacas não infectadas (retiro 2), que se incorporaram ao rebanho do retiro 1, foi capaz de controlar a disseminação da doença. No período de observação de 15 meses, não ocorreram abortos ou outros sinais clínicos entre as vacas vacinadas, enquanto algumas abortaram ou deram cria a bezerros fracos, entre as não vacinadas (grupo infectado), que permaneceram no rebanho. Com relação à persistência de títulos à soro-aglutinação rápida (SAR), verificou-se que 12% (7/58) das vacas eram reagentes a essa prova (títulos ≥ 1:100), transcorridos 4 meses da segunda vacinação. Com relação à prova do anel do leite (PAL), 5 vacas ainda permaneceram reagentes, após 240 dias da segunda vacinação (títulos ≥ 1:16). Tendo-se em vista os resultados ao teste do cartão (TC) e à prova do rivanol (RIV), esses animais estariam infectados (em período de incubação) na época da vacinação. Com relação às vacas procedentes do rebanho livre (retiro 2), os resultados sorológicos foram mais homogêneos, sendo que, 4 meses após a primeira e 2 meses após a segunda vacinação, nenhum animal apresentou título ≥ 1:100 à SAR, positividade ao TC ou reação ao RIV. A PAL passou a ser negativa 90 dias após a segunda vacinação.

69. Lima W.S., Costa H.M.A., Costa J.O., Guimarães M.P. & Leite A.C.R. 1982. **Eficiência anti-helmíntica do Cloridrato de Tetramisol e Fenbendazol em bezerros.** [Anthelmintic efficacy of Tetramisol Chloridrate and Fenbendazole in naturally infected calves.] *Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte*, 34 (2): 325-328. Inst. Ciênc. Biologia, Esc. Vet., Univ. Fed. Minas Gerais, Cx. Postal 567, Belo Horizonte, MG 30000.

Dezessies bezerros, naturalmente infectados com nematóides gastrintestinais, foram divididos em quatro grupos, tratados com anti-helmínticos e mantidos em condições de não

reinfeção. Sete dias após, foram necropsiados para recuperação dos parasitos. Observou-se que nos animais tratados com 5 mg/kg e 10 mg/kg de Cloridrato de Tetramisol e 7,5 mg/kg de Fenbendazol, houve redução, respectivamente, de 83,0, 85,1 e 100,0% para *Trichostrongylus* sp.; 94,3, 99,4 e 97,6% para *Cooperia punctata*; 97,6, 99,5 e 100,0% para adultos de *Haemonchus* sp.; 4,8, 100,0 e 92,1% para estádios larvários de *Haemonchus* sp.; 98,4, 99,4 e 100,0% para *Oesophagostomum radiatum*; 71,8, 75,4 e 100,0% para larvas de quinto estágio de *Oesophagostomum radiatum* e 97,9, 96,6 e 100,0% para *Bunostomum phlebotomum*. Considerando-se os resultados obtidos, nas condições em que o experimento foi realizado, pode-se considerar que o Cloridrato de Tetramisol, na dose de 10 mg/kg, foi mais eficiente contra *Cooperia punctata* e formas imaturas de *Haemonchus* sp.; o Fenbendazol, na dose de 7,5 mg/kg, mostrou-se mais eficiente contra *Bunostomum phlebotomum*, *Trichostrongylus* sp. e espécimes adultas e do quinto estágio de *Oesophagostomum radiatum*.

70. Souza I.S., Moreira W.S., Santos A.F., Santurio J.M. & Martins A.L.F. 1982. **Importância dos felinos domésticos na epidemiologia da Hidatidose.** [Importance of the cat in the epidemiology of Hydatid disease.] *Revta Centro Ciênc. Rurais UFSM, Sta Maria*, 12(4): 203-206. Centro Ciênc. Rurais, Univ. Fed. Sta Maria, Santa Maria, RS 97100.

Estudou-se os felinos domésticos como hospedeiros definitivos do *Echinococcus granulosus* por infecção experimental destes com 30.000 protoescoléces viáveis provenientes de cistos hidáticos de bovinos. Em nenhum caso houve a ocorrência deste parasita, concluindo-se a não importância do ciclo bovino-felino na epidemiologia da Hidatidose.

PATOLOGIA, CLÍNICA E CIRURGIA

71. Siqueira A.J., Thiesen W.L., Amaral M.H., Teixeira J.S.A. & Endier J.O. 1980. **Relação entre as proteínas séricas e a fecundidade de novilhas de corte.** [Relationship between serum protein and fertility of beef heifers.] *Revta Bras. Reprod. Animal* 4(1-2): 19-20. Fac. Vet., Univ. Fed. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90000.

Com o intuito de relacionar as concentrações séricas de proteína total e albumina, foram colhidas amostras de sangue de 69 novilhas sadias. Estas foram submetidas a inseminação e repasse com monta natural e ao diagnóstico de prenhez 65 dias após. Observou-se alta percentagem de novilhas vazias entre as que apresentaram baixas concentrações séricas de proteína total e albumina, relação albumina-globulina abaixo da média e baixa percentagem de infecundas entre as que possuíam um ou mais parâmetros acima da média. Trabalhando matematicamente os dados, chegou-se à equação: $\% NF = 30 \frac{3_2}{n} +$

83,9, onde %NF é o número provável de novilhas fecundas, n_2 o número de animais com 3 parâmetros abaixo da média e n o número total de novilhas, a qual permite a previsão aproximada da percentagem de fecundação. Nos parâmetros linear e angular da equação, que serão estabelecidos após

levantamentos semelhantes com elevado número de animais, deverão ser incluídas as percentagens de aborto e mortalidade pós-natal, para que a equação avalie também a produtividade aproximada do rebanho.

72. Barnabe V.H., Barnabe R.C., Visitin J.A., Viana W.G., Casagrande J.F. & Almeida C.A. 1980. **Estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termoresistência para avaliação de sêmen congelado.** [Relationship of quick thermoresistance test compared to slow thermoresistance test for evaluation of frozen semen.] *Revta Bras. Reprod. Animal* 4(3-4): 7-12. Depto Cirurgia e Obstetrícia, Fac. Med. Veterinária e Zootecnia, Univ. S. Paulo, São Paulo, SP 05508.

Após descongelamento e avaliação da motilidade progressiva dos espermatozoides, o conteúdo de 200 ampolas de sêmen foi dividido, em partes iguais, em dois tubos, mantendo-se um em banho-maria a 38°C durante cinco horas (prova lenta de termoresistência) e outro a 45°C por uma hora (prova rápida de termoresistência), quando então foram novamente avaliadas as motilidades progressivas. A média obtida para motilidade progressiva após o descongelamento foi de 46,15%, sofrendo uma queda para 19,77% depois do teste rápido e para apenas 6,12% após o teste lento. Comparando-se os valores obtidos para as duas provas, encontrou-se um coeficiente de correlação ($r = 0,38$) positivo e altamente significativo, embora de média intensidade. Conclui-se que desde que a seleção do material seminal e a técnica de congelamento sejam rigorosas, a prova rápida de termoresistência poderá substituir a prova lenta para avaliação rotineira de sêmen congelado.

73. Barnabe R.C., Barnabe C.H., Viana W.G., Visitin J.A., Casagrande J.F. & Almeida C.A. 1980. **Efeito do tempo de conservação de sêmen congelado de bovinos sobre a motilidade progressiva dos espermatozoides e a retenção do acrossomo.** [Effect of storage time upon progressive motility and acrosomal integrity of frozen bull semen.] *Revta Bras. Reprod. Animal* 4(3-4): 13-20. Depto Cirurgia e Obstetrícia, Fac. Med. Veterinária e Zootecnia, Univ. S. Paulo, São Paulo, SP 05508.

Duzentas ampolas de sêmen de bovinos, constituindo quatro grupos de 50, correspondentes a congelamentos efetuados, respectivamente, nos anos de 1975, 1976, 1977 e 1978, foram estudadas para avaliação da motilidade progressiva e porcentagem de patologia do acrossomo, após o descongelamento. Os exames da motilidade progressiva dos espermatozoides foram realizados em microscópio óptico, com aumento de 200x e os da patologia do acrossomo em microscopia de contraste de interferência diferencial, com aumento de 1250x. Os resultados das análises de variância mostraram haver diferença estatística, altamente significativa ($P < 0,01$) entre os anos de congelamento, no que se refere à motilidade progressiva e à patologia do acrossomo.

74. Rodrigues J.L., Silva C.A.M., Hahn J., Rubim M.B., Costa C.D. & Pinto C.S. 1980. **Viabilidade do emprego da transferência de embriões bovinos a nível de campo no Rio Grande do Sul, Brasil.** [Viability of the transfer in cattle under field conditions in Rio Grande do Sul, Brazil.] *Revta Bras.*

Reprod. Animal 4(3-4):33-37. Setor de Fisiopatologia da Reprodução, Univ. Fed. Sta Maria, Santa Maria, RS 97100.

No âmbito das atividades do Convênio Hannover-Santa Maria, foi realizado um experimento de transferência de embriões a nível de campo no Rio Grande do Sul, durante os meses de setembro, outubro e novembro de 1979. Como doadoras foram utilizadas 14 fêmeas das raças Holandesa (3), charolesa (3) e Aberdeen-Angus (8). Como receptoras foram selecionadas vacas das raças Charolesa e Aberdeen-Angus. Realizou-se a superovulação e sincronização do ciclo estral dos animais através da administração de FSH ou PMSG e análogo de Prostaglandina. Dez vacas (70%) responderam a superovulação (4 corpos lúteos/animais). No sétimo dia após o cio 61 embriões foram coletados pelo método não cirúrgico, dos quais 36 (59%) com morfologia e desenvolvimento normais. Das 29 transferências cirúrgicas realizadas, 13 (45%) resultaram em diagnóstico positivo de prenhez 60 dias após.

75. Bacalhau A.S., Santiago C.M., Garcia J.T.C., Leal J.J.B. & Portalla J.S. 1981. Efeito da antibioticoterapia na fecundidade de vacas leiteiras. [Antibiotic therapy effect on the fecundity of dairy cows.] *Revta Bras. Reprod. Animal* 5(1-2):25-28. Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba-EMEP, João Pessoa, PB 58000.

Para verificar o efeito de antibióticos, intrauterinamente, sobre a fecundidade à primeira inseminação foram utilizadas 32 vacas da raça Holandesa, com idades variando entre três e dez anos e sem problemas associados ao parto. Os animais foram distribuídos, em relação à data do parto, em dois grupos: vacas testemunhas e aquelas tratadas com antibióticos, cujos índices de concepção foram de 56,0 e 37,5% respectivamente. Estes resultados embora não tenham apresentado diferença significativa ($P < 0,10$), demonstram que o uso de antibióticos para aumentar a fecundidade de vacas leiteiras, sem problemas associados ao parto não é aconselhado.

76. Silva A.E.D.F. 1981. Determinação da concentração de estrógeno total e progesterona no plasma sangüíneo de vacas em partos distócicos e sua relação com a abertura do cervix. [Concentration of total estrogen and progesterone in the cow peripheral plasma by radioimmossay with difficult in births relation to the cervical dilation.] *Revta Bras. Reprod. Animal* 5(1-2):29-36. Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, Sobral, Ceará 62100.

As concentrações de estrógeno total e progesterona foram determinadas por radioimunoensaio (RIE) no plasma sangüíneo de 49 vacas em trabalho de parto, encaminhadas à Clínica Obstétrica e Ginecológica da Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover. As coletas de sangue foram praticadas no momento do parto e, posteriormente, a cada seis horas até as 36 horas pós-parto. Relacionando-se a concentração de estrógeno total no plasma durante o parto com a abertura cervical, verificou-se uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os níveis hormonais de vacas com dilatação de 1º e 3º graus de cervix, ou seja, $5,47 \pm 2,80$ e $2,51 \pm 1,85$ nmol/l, respectivamente. Por outro lado, os animais que apresentavam dilatação total da cervix ou parcial de 1º grau, registraram concentrações

mais altas de estrógeno total ($4,47 \pm 3,06$ e $5,47 \pm 2,80$ nmol/l de plasma, respectivamente) do que as com abertura incompleta de 1º e 3º graus ($3,59 \pm 1,73$ e $2,51 \pm 1,85$ nmol/l de plasma, respectivamente). Poder-se-ia concluir que, durante o parto, existe uma correlação positiva a nível de estrógenos totais e dilatação do canal cervical, já que ao mais alto nível desse hormônio corresponde uma maior dilatação da cervix. Já os níveis de progesterona não indicam nenhuma correlação entre o nível deste hormônio e os diferentes graus de dilatação cervical.

77. Silva A.E.D.F. 1981. Determinação da concentração plasmática de progesterona e estrógeno total em vacas com partos distócicos e sua relação com a retenção da placenta. [Plasma concentration of progesterone and total oestrogen in cow with difficult birth and its relation with retention of the placenta.] *Revta Bras. Reprod. Animal* 5(1-2):41-49. Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, Sobral, Ceará 62100.

As concentrações de progesterona e estrógeno foram determinadas através de radioimunoensaio (RIE), no plasma sangüíneo de 49 vacas, encaminhadas à Clínica Obstétrica e Ginecológica da Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover. As coletas de sangue foram praticadas com intervalos de seis horas, desde o momento do parto até 36 horas após. A concentração plasmática de progesterona no momento do parto, não foi significativamente diferente entre animais com e sem retenção de placenta. Após o parto, a mesma manteve-se alta até 36 horas depois, nos animais com retenção de placenta. Às seis e 18 horas após o parto encontram-se diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os grupos com retenção e sem retenção de secundinas. Os níveis de estrógeno total não mostraram diferenças nos animais com e sem retenção de placenta, tanto no momento do parto como até 36 horas depois.

78. Fonseca V.O., Norte A.L., Chow L.A. & Azevedo N.A. 1981. Inseminação artificial em bovinos de corte. II. Efeito da qualidade do sêmen sobre a fertilidade. [Artificial insemination in beef cattle. II. Effect of semen quality on fertility.] *Revta Bras. Reprod. Animal* 5(3-4):21-25. Esc. Vet., Univ. Fed. Minas Gerais, Cx. Postal 567, Belo Horizonte, MG 30000.

Com a finalidade de estudar o índice de fertilidade de touros de três diferentes padrões de qualidade de sêmen, analisaram-se 878 inseminações durante uma estação de reprodução que se estendeu do mês de novembro ao mês de maio. Foram utilizados três touros, nºs I, II e III, sendo o primeiro da raça Holandesa, variedade vermelha e branca, o segundo da raça Holandesa variedade preta e branca e o terceiro da raça Chianina. Todos foram submetidos a colheitas e industrialização do sêmen numa mesma Central de inseminação artificial durante aproximadamente o mesmo período do ano, tendo sido todos os ejaculados analisados sob o ponto de vista dos aspectos físicos e morfológicos (espermograma). Com base nos espermogramas, os touros foram classificados em três padrões, "A", "B" e "C". O sêmen obtido, envasado em palhetas, foi aplicado em 878 vacas de raças Zebuínas. Os resultados mostraram que dos 185 inseminados com o material proveniente

do touro I (padrão A), 150 (81,1%) resultaram gestantes, enquanto que das 206 inseminadas com o sêmen do touro II (padrão B) ocorreram 149 (72,3%) gestações positivas das 487 servidas pelo touro III (padrão C) 305 (62,6%) estavam também gestantes. Pela análise do X^2 verificaram-se diferentes dispersões entre os três touros, revelando que o sêmen com menor índice de patologia total em melhor qualidade física esteve relacionado com taxas de fertilidade mais elevadas, permitindo concluir que melhores resultados deverão ser conseguidos em programas de inseminação, onde se utilizem sêmen com controle de qualidade (espermiograma) e de padrão elevado.

79. Tahira J.K., José W.P.K. & Moreira M.J. 1981. **Sincronização do ciclo estral de fêmeas Nelore pelo sal do dinoprost tromethamine.** [Estrous cycle synchronization in zebu females (*Bos indicus*) by the dinoprost tromethamine salt.] *Revta Bras. Reprod. Animal* 5(3-4): 45-49. Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, Curitiba, PR 80000.

Um experimento foi conduzido no Centro de Produção e Experimentação de Paranaíba (Noroeste do Paraná), com o objetivo de controlar o ciclo estral de fêmeas da raça Nelore pela administração do dinoprost tromethamine (lutalyse). Setenta e nove fêmeas consideradas aptas após a realização do exame clínico-ginecológico foram distribuídas em três grupos: o primeiro (grupo I) constituído de 26 e o segundo (grupo II) de 25 animais, receberam uma injeção intramuscular de 25 mg do produto e, o terceiro (grupo III) de 28 animais, foi utilizado como controle. Com auxílio de rufiões, as fêmeas pertencentes aos grupos I e III foram observadas três vezes ao dia, sendo as que apresentaram sintomas psíquico-clínicos de estro, inseminadas em torno de 12 horas após a constatação da aceitação da monta. Os componentes do grupo I que não manifestaram estro nos primeiros 11 dias após a injeção do produto e todos os do grupo II receberam uma segunda dose, sendo que os do grupo I foram inseminados conforme a apresentação do estro e os do grupo II em horários pré-determinados de 72 e 96 horas (duas inseminações) após a segunda aplicação. A incidência de estro foi de 80,7 e 82,1%, respectivamente para os grupos I (2º ao 4º dia após as injeções) e II (período de 21 dias). O índice de fecundação do total de vacas inseminadas foi de 51,1; 29,2 e 56,5%, respectivamente, para os grupos I e II e III, não sendo contactados diferenças significativas entre os grupos I e III, mas ambos significativamente diferentes do grupo II ($P < 0,1$). Os resultados obtidos, permitem concluir que o dinoprost tromethamine é um composto eficiente para sincronizar o ciclo estral de fêmeas da raça Nelore, resultando em fertilidade satisfatória quando a inseminação é praticada com a observação do estro após as injeções, mas apresentadas em horários fixos.

80. Costa S.A., França M.P. & Vinha N.A. 1982. **Inseminação artificial em cabras nativas, com sêmen congelado, após**

sincronização do cio com prostaglandina F_2 alfa. [Artificial insemination of native goats, with frozen semen, following synchronization of estrus with prostaglandin F_2 alfa.] *Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte*, 34(2): 273-277. Esc. Agronomia e Veterinária, Univ. Fed. Goiás, Cx. Postal 697, Goiânia, Goiás 74.000.

Dois grupos (A e B) de cabras nativas não lactantes, criadas em regime semi-extensivo, em região de clima tropical semi-árido, foram submetidos a sincronização de cio nas estações de seca e chuva, respectivamente. Todas as cabras receberam uma primeira dose de prostaglandina F_2 alfa, análoga equivalente a 0,265 mg de cloprostenol sódico. As fêmeas do grupo A (estação seca) não responderam ao tratamento. As fêmeas do grupo B (estação das chuvas) que mostraram cio frente ao rufião foram inseminadas (subgrupo B₁). As que não manifestaram cio receberam uma segunda dose de PGF₂ alfa 11 dias após a primeira e foram inseminadas sem observação de cio, com duas doses de sêmen em horários pré-fixados de 72 e 96 horas após o segundo tratamento (subgrupo B₂). A taxa de parição foi de 62,50% para o subgrupo B₁ e 77,27% para o subgrupo B₂. A média da taxa de parição dos animais tratados, com e sem observação de cio foi de 73,33%.

81. Silva S.F., Santos A.F., Lauzer J.J. & Costa D.F. 1982. **Linfadenite Caseosa em ovinos abatidos na região da campanha do Rio Grande do Sul.** [Caseous Lymphadenitis in the sheep production areas of Rio Grande do Sul, Brazil.] *Revta Centro Ciênc. Rurais UFSM, Sta Maria*, 12(2-3): 149-154. Depto Med. Vet., Univ. Fed. Sta Maria, Santa Maria, RS 97100.

Em 9.410 ovinos abatidos, foi constatado que a Linfadenite Caseosa afeta frequentemente o linfonodo pré-escapular. As ovelhas apresentam uma incidência maior (8,09%) que os capões (1,53%). Dos municípios estudados, Lavras do Sul apresenta maior incidência em capões (1,86%) e Livramento em ovelhas (13,19%).

82. Moraes G.V. & Lauzer J.J. 1982. **Efeito da idade de castração sobre o crescimento de bovinos de corte.** [Effect of castration age on beef cattle growth.] *Revta Centro Ciênc. Rurais UFSM, Sta Maria*, 12(2-3): 155-162. Depto Ciênc. Agrárias, Univ. Estadual de Maringá, Paraná, PR 80000.

Foi estudado a influência de três idades de castração sobre o crescimento de bovinos de corte. Foram utilizados 27 terneiros distribuídos em três tratamentos: 1) castrados aos dois meses de idade; 2) castrados aos sete meses de idade e 3) castrados aos 12 meses de idade. Os animais foram abatidos com aproximadamente 40 meses de idade. Não foi observado diferença significativa da idade de castração no ganho de peso dos animais, por ocasião do abate.

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS PELOS MÉTODOS CIRÚRGICO E NÃO CIRÚRGICO¹

MARA I.B. RUBIN², C.P.D. COSTA³, C.S. PINTO³, J.L. RODRIGUES⁴,
R.M. GREGORY⁴, J. HAHN⁵ E CARLOS A.M. SILVA⁶

ABSTRACT.- Rubin M.I.B., Costa C.P.D., Pinto C.S., Rodrigues J.L., Gregory R.M., Hahn J. & Silva C.A.M. 1983. [Surgical and non-surgical embryo transfer in cattle.] Transferência de embriões em bovinos pelos métodos cirúrgico e não cirúrgico. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 3(4): 103-106. Depto Clínica de Grandes Animais, Univ. Fed. Santa Maria, Santa Maria, RS 97100, Brazil.

From October through December, 1980, a study of embryo transfer in cattle was carried out in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Twenty-five cows were used as donors. The breeds involved were Hereford (10), Aberdeen Angus (4), Normand (6) and Charolais (5). Forty cows Hereford Aberdeen Angus, Normand, Charolais and Holstein crosses were used as recipients. Oestrus synchronization and superovulation were obtained using prostaglandins alpha analogue and PMSG. Fourteen (56%) of the donors responded well to the superovulation treatment with PMSG, producing an average of 6.2 corpora lutea per animal. Thirty-eight embryos were collected by the non-surgical method, 29 of these being normal in development and its morphology normal. After 21 transfers using the surgical method 15 (71%) recipients became pregnant. Two out of 6 (33%) recipients treated by the non-surgical method sustained the pregnancy. It is concluded that the surgical method for bovine embryo transfer is still the most efficient. However, the need for rapid improvement in the non-surgical method is stressed, due to its simplicity and easy manipulation in the field.

INDEX TERMS: Bovine, embryo transfer.

SINOPSE.- Durante outubro e dezembro de 1980 foi desenvolvido um estudo na área de transferência de embriões em bovinos no Rio Grande do Sul. Como doadoras foram utilizadas 25 fêmeas das raças Hereford (10), Aberdeen-Angus (4), Normanda (6) e Charolesa (5). Para receptoras foram selecionadas vacas cruza Holandesa e das raças supracitadas. Obteve-se a sincronização do ciclo estral e superovulação através da aplicação de um análogo de prostaglandina⁷ F₂ alfa e de PMSG⁸. Das 25 vacas superovuladas 14 (56%) responderam ao tratamento com PMSG com uma média de 6,2 C.I./animal. Foram coleta-

dos 38 embriões pelo método não cirúrgico, sendo 29 (76%) com morfologia e desenvolvimento normais. Após 21 transferências pelo método cirúrgico, 15 (71%) receptoras resultaram gestantes; após 6 pelo não cirúrgico 2 (33%) receptoras mantiveram a gestação. Conclui-se ainda que o método de transferência cirúrgica é o mais eficiente e que há a necessidade de acelerar-se o aperfeiçoamento do método de transferência não cirúrgico em função da simplicidade e rapidez da manipulação para trabalhos a nível de campo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bovino, transferência de embrião.

¹ Aceito para publicação em 16 de maio de 1983.

Trabalho realizado com auxílio da GTZ (Genellschaft f. Technische Zusammenarbeit), Rep. Federal da Alemanha.

² Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Univ. Fed. Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97100.

³ Médico Veterinário autônomo, Clínica da Reprodução, Cruz Alta, RS 98100.

⁴ Depto de Clínica da Reprodução, Univ. Fed. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90000.

⁵ Depto Biol. Exp., Klinik f. Geburtshilfe u. Gynaekologie des Rindes, Escola de Veterinária de Hannover, Bischofsholer Damm 15, D-3000-Hannover 1, Alemanha Ocidental.

⁶ Depto Clínica de Grandes Animais, Setor de Fisiopatologia da Reprodução, UFSM, Santa Maria, RS 97100.

⁷ CIOSIN, Cia. Imperial de Ind. Químicas do Brasil S.A.

⁸ INTERGONAN^R, VEMIE Veterinaer Chemie GmbH, Impfstoffwerk, D-4152 Kempen 1, Alemanha Ocidental.

INTRODUÇÃO

Com a técnica da inseminação artificial conseguiu-se multiplicar as possibilidades de transmissão dos caracteres de um único animal de alto padrão genético, permitindo um rápido incremento na qualidade do rebanho. Do lado feminino, porém, continuou fechada a chance de aumentar a potencialidade de produção que anda em torno de quatro bezerras por vida útil.

Com o advento da transferência de embriões em bovinos foi aberta essa possibilidade de aprimorar e multiplicar qualidades desejadas das matrizes.

Os primeiros produtos obtidos por transferência de embriões em bovinos foram resultado de tentativas feitas em 1951, por Willet et al., quando por meio do método cirúrgico foram colhidos óvulos fecundados de vaca, os quais também foram transferidos por via cirúrgica.

Averill et al. (1955) transferiram embriões de ovelhas ao oviduto de coelhas em diestro e conseguiram colher 50% deles, cinco dias após, em estado normal de desenvolvimento.

Os métodos utilizados em transferência de embriões tiveram grande desenvolvimento na última década e os conhecimentos adquiridos na área de colheita, cultivo, conservação e transferência permitem, atualmente, a utilização da técnica em escala comercial em alguns países da Europa e América do Norte. Através da técnica de transferência cirúrgica de embriões já se alcançaram em nosso país resultados semelhantes àqueles de países mais desenvolvidos (Rodrigues et al. 1980).

Para que se alcance a ovulação simultânea de muitos óvulos, utiliza-se hoje a técnica da superovulação. Para isso existem dois métodos básicos de tratamento: por um lado com gonadotropina sérica (PMSG) e por outro com hormônio folículo estimulante (FSH) (Hahn 1978). Muitos autores concordam que um único tratamento com 1500 a 3000 UI de PMSG ou o tratamento com um total de 25 a 50 mg de FSH-P, duas vezes ao dia durante cinco dias, trazem hoje excelentes resultados (Betteridge 1977, Foote & Onuma 1970, Hahn et al. 1976, Lamond 1974, Seidel et al. 1977, Sreenan & Beehan 1976). Hahn (1978) cita que o tratamento deve ser realizado no final da fase de corpo lúteo, mas que isso traria algumas dificuldades se fosse utilizado o ciclo estral natural. Para isso, foi simplificado o método anteriormente citado introduzindo-se o uso de prostaglandina (Tervit et al. 1973).

Planejou-se este programa de trabalho com o objetivo de testar, a nível de campo, a eficiência do método não cirúrgico para transferência de embriões, em comparação com a técnica já testada em nosso meio.

MATERIAL E MÉTODOS

As fêmeas doadoras e receptoras foram selecionadas e preparadas levando-se em consideração a história reprodutiva, o ciclo estral e a saúde genital. A seleção foi realizada em quatro propriedades situadas nos municípios de Uruguaiana (2), Camaquã (1) e São Gabriel (1), no Estado do Rio Grande do Sul. Como doadoras foram utilizadas 25 vacas das raças Hereford (10), Aberdeen-Angus (4), Normanda (6) e Charolesa (5), correspondendo essas raças aos grupos I, II, III e IV. Para receptoras foram selecionadas fêmeas cruzas Holandesa e das raças supracitadas. Tanto as doadoras como as receptoras, com idade entre 3 e 12 anos, foram mantidas em regime de criação extensiva.

O ciclo estral das doadoras e receptoras foi sincronizado com dupla injeção de 500 mcg de um análogo de Prostaglandina F₂ alfa, com intervalo de 11 dias.

Os tratamentos utilizados seguiram os esquemas convencionais de superovulação (Hahn 1978, Seidel et al. 1977). Para obtenção da superovulação foram administradas 3000 UI de PMSG numa única injeção nove dias após o tratamento com um análogo de Prostaglandina F₂ alfa.

Dois dias após este tratamento foi aplicada a segunda dose de PGF₂ alfa. Ambas as drogas foram aplicadas por via intramuscular. Quarenta

e oito horas mais tarde foi realizado o controle do cio dos animais. Todas as doadoras que apresentaram cio foram inseminadas três vezes, com intervalos de 12 horas, utilizando-se sêmen congelado, enquanto que as receptoras que responderam ao tratamento do análogo de Prostaglandina aguardavam o momento da transferência.

Os embriões foram coletados entre o sexto e o sétimo dias após a inseminação pela lavagem do útero por via cervical (não cirúrgica), com cateter modelo Neustadt a.d. Aisch (Baumgartner et al. 1977), utilizando-se o meio Dulbecco's PBS modificado (Brand et al. 1977, Elsdén et al. 1976, Hahn et al. 1977).

Na Figura 1 pode-se observar esquematicamente a seqüência da metodologia de trabalho.

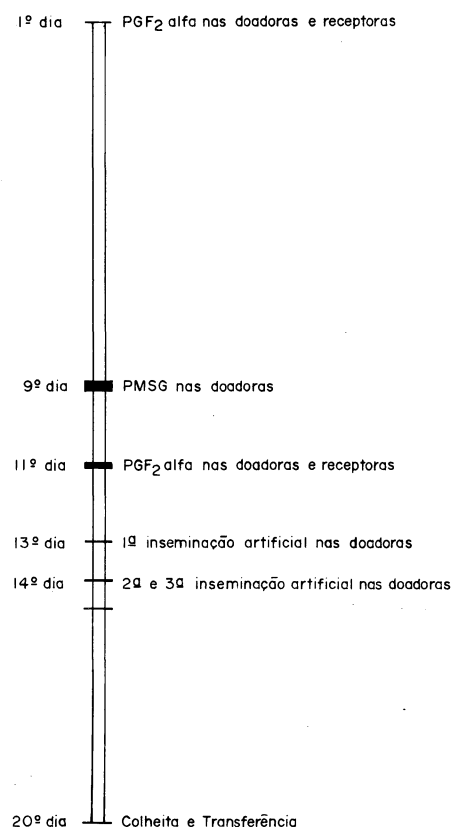


Fig. 1. Esquema de aplicação do análogo de PGF₂ alfa, do PMSG, da inseminação artificial, da colheita e da transferência dos embriões.

Após a colheita os embriões foram examinados microscopicamente e conservados em meio de cultivo (Dulbecco's PBS modificado com 20% de soro de feto bovino) à temperatura de 37°C até o momento da transferência.

Os embriões foram transferidos pelo método cirúrgico para a porção distal do corno uterino correspondente ao ovário contendo o corpo lúteo, após ter sido realizada a laparotomia no flanco do mesmo lado.

As transferências não cirúrgicas foram realizadas por via cervical, utilizando-se cateter metálico com ponta romba, procurando-se depositar o embrião na mesma porção do corno uterino em que foi colocado na transferência cirúrgica.

RESULTADOS

Observa-se no Quadro 1 o resultado do tratamento com PMSG para indução da superovulação nos quatro grupos de vacas doa-

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS

doras. Através do exame retal constatou-se que, em cada grupo, 50-66% ($\bar{X}$ = 56%) das doadoras apresentaram reação positiva, isto é, dois ou mais corpos lúteos. Onze matrizes tratadas apresentaram apenas um corpo lúteo.

Os resultados individuais do tratamento para superovulação podem ser observados no Quadro 2. Através da contagem dos corpos lúteos em ambos os ovários por via retal, verifica-se que tanto o número de corpos amarelos como o de embriões colhidos variou muito em cada grupo e entre os grupos. No grupo I verifica-se uma média de 10,2 corpos lúteos por doadora (variação = 6 – 17), no grupo II, 3,5 (variação = 2 – 5), no grupo III, 4,2 (variação = 2 – 6) e no grupo IV, 4,0 (variação = 2 – 7). Nota-se, também, um maior número de embriões recuperados no grupo I (29), em contraste com os números dos grupos II

Quadro 1. Descrição das matrizes com reação positiva após tratamento com PMSG

Grupo	Matrizes tratadas	Matrizes com reação positiva ^(a)	
		Nº	%
I	10	5	50
II	4	2	50
III	6	4	66
IV	5	3	60
Total	25	14	56

(a) Sob reação positiva entende-se mais de duas ovulações.

Quadro 2. Descrição do aproveitamento dos embriões após colheita em relação ao número de corpos lúteos alcançados através da superovulação com PMSG

Grupo	Doadora	Nº de C.L./doadora	Nº de embriões colhidos	% de embriões recuperados	Nº de embriões transferidos
I	A	17	17	100	15
	B	10	3	30	3 ^(a)
	C	10	2	20	2 ^(a)
	D	8	3	37	3
	E	6	4	66	4
II	F	5	2	40	2
	G	2	2	100	—
III	H	5	4	80	—
	I	2	1	50	—
	J	6	3 ^(b)	50	—
	K	4	3 ^(b)	75	—
IV	L	7	—	—	—
	M	3	—	—	—
	N	2	—	—	—
Total	14	87	44	50	29

(a) Gêmeos.

(b) Óvulos.

Quadro 3. Descrição do número de embriões viáveis transferidos e do método de transferência em relação aos resultados do diagnóstico de gestação realizado sessenta dias após a transferência de embriões

Grupos	Número de embriões colhidos	Número de embriões transferidos	Número de receptoras	Resultados obtidos			
				Método cirúrgico		Método não cirúrgico	
				Transf. (a)	% Gest. (b)	Transf. (a)	% Gest. (b)
I (n = 10)	29	27 ^(a)	25	20	75,0	5	40,0
II (n = 4)	4	2	2	1	—	1	—
III (n = 6)	11	—	—	—	—	—	—
IV (n = 5)	—	—	—	—	—	—	—
Total (n = 25)	44	29	27	21	71,0	6	33,0

(a) Número de transferências realizadas.

(b) Percentagem de vacas gestantes após 60 dias da transferência.

(4), III (5) e IV (0), o que está diretamente relacionado com o resultado de superovulação. Das 44 estruturas recuperadas através da lavagem uterina de todas as doadoras, 38 eram embriões em diferentes fases de desenvolvimento, dos quais 29 eram viáveis para transferência. De cada uma das doadoras J e K foram recuperados três óvulos não fecundados. Verifica-se, ainda, que apenas 50% das estruturas esperadas foram recuperadas pela lavagem não cirúrgica do útero.

Conforme descrito no Quadro 3, 29 embriões viáveis foram transferidos para 27 receptoras, tendo duas delas recebido dois embriões cada uma. Nas 21 transferências realizadas pelo método cirúrgico foram utilizados 23 embriões, e nas transferências pelo método não cirúrgico, seis embriões.

Sessenta dias após as transferências foi efetuado o diagnóstico de gestação nas vacas receptoras. Quinze (71%) receptoras que receberam embriões pelo método cirúrgico encontravam-se gestantes e duas (33%) gestavam após transferência pelo método não cirúrgico.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A incidência de superovulação de 56% observada neste trabalho encontra-se em níveis superiores àqueles descritos por Hahn et al. (1976), Baumgartner et al. (1977), Betteridge (1977) e Brand et al. (1977). Esta diferença, provavelmente, fundamenta-se no reduzido número de matrizes avaliadas neste trabalho.

Após a indução da superovulação e verificação do número aproximado de ovulações por doadora, através da palpação retal, verifica-se que a percentagem de embriões recuperados (50%) se situa em índices semelhantes aos descritos por Alexander et al. (1976) e Elsdén et al. (1976).

O alto índice de aproveitamento alcançado após transferência pelo método cirúrgico – gestação em 71% das receptoras – coloca os resultados obtidos neste trabalho aproximadamente 10% acima dos obtidos por Screenan e Beehan (1976).

O índice de aproveitamento pelo método de transferência não cirúrgico resultou mais baixo que o do método cirúrgico. Porém os 33% de receptoras gestantes após transferência não cirúrgica estão equiparados aos resultados obtidos por Brand et al. (1976).

Levando-se em consideração os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a transferência de embriões pelo método cirúrgico a nível de fazenda pode ser utilizada na prática no Rio Grande do Sul, com um índice de manutenção de gestação em torno de 60%, o que se assemelha aos resultados obtidos noutros países mais desenvolvidos.

Embora a metodologia do método não cirúrgico em transferência de embriões seja mais simples, não se pode aconselhar seu uso na prática. Apesar do número reduzido de transferências realizadas por esse método neste trabalho, os resultados obtidos se equivalem aos descritos na literatura, o que nos permite fazer essa afirmação.

Deve-se, isso sim, continuar aprimorando a técnica de transferência de embriões pelo método não cirúrgico, a fim de colocá-la, no mais breve período de tempo possível, em nível

de aproveitamento compatível com o do método cirúrgico, o que ampliaria enormemente as possibilidades de disseminação deste sofisticado método de melhoramento zootécnico.

Agradecimentos. - Agradecemos sinceramente o apoio oferecido pela GTZ (Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit), pelo CNPq e pelo Prof. Severo Salles de Barros (Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria), para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Alexander A.M., Markus A.N. & Hooton J.K. 1976. Non-surgical bovine embryo recovery. *Vet. Rec.* 99:221.
- Averill R.L.W., Adams C.E. & Rowson L.E.A. 1955. Transfer of mammalian ova between species. *Nature* 176: 167.
- Baumgartner G., Hahn J., Hahn R. & Schneider U. 1977. Erfahrungen mit der unblutigen Eigewinnung. *Zuchthyg.* 12:39.
- Betteridge K.J. 1977. Superovulation, p. 1-9. In: Betteridge K.J. (ed.) *Embryo transfer in farm animals. A review of techniques and applications.* Canada Department of Agriculture Monograph 16.
- Brand A., Aarts M.H., Zaayer D. & Oxender D. 1977. Recovery and transfer of embryos by non-surgical procedures in lactating dairy cattle. EEC, Conference "Control of Reproduction in the Cow", Galway, Sept. 27-30.
- Elsden R.P., Hasler J.F. & Seidel G.E. 1976. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenol.* 6: 523-532.
- Foot R.H. & Onuma H. 1970. Superovulation, ovum collection, culture and transfer. A Review. *J. Dairy Sci.* 53: 1681-1692.
- Hahn J. 1978. Die unblutige Eigewinnung beim Rind unter Beruecksichtigung der Vorbereitung der Spendertiere und der Entwicklung der Eizellen im Eileiter und Gebaermutter. *Dtsch. Tieraerztl. Wschr.* 85: 140-145.
- Hahn J., Hahn R., Luhmann F., Baumgartner G., Lorrman W. & Zoder H.F. 1976. Ergebnisse der Superovulation bei Faersen nach kombinierter PMSG/PGF₂ alpha-Behandlung. *Berl. Münch. Tieraerztl. Wschr.* 89: 89-93.
- Hahn J., Hahn R., Baumgartner G., Lotthammer K.H., Lorrman W., Schneider U., Traub J. & Zoder H.F. 1977. Untersuchungen zur Verbesserung der Auswahl von Spender – und Empfängertieren in Rahmen der Eiuebertragung beim Rind. *Zuchthyg.* 12: 68-76.
- Lamond D.R. 1974. Multiple births in cattle: An assessment. *Theriogenol.* 1: 181-212.
- Rodrigues J.L., Silva C.A.M., Hahn J., Rubin M.I.B., Costa C.D. & Pinto C.S. 1980. Viabilidade do emprego da transferência de embriões bovinos a nível de campo no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revta Bras. Reprod. Anim.* 4 (3-4): 33-37.
- Seidel G.E., Elsdén R.P., Nelson L.D. & Bowen R.A. 1977. Superovulation of cattle with PMSG and FSH. EEC, Conference "Control of reproduction in the cow", Galway, Sept. 27-30.
- Screenan J.M. & Beehan D. 1976. Methods of induction of superovulation in the cow and transfer results, p. 19-34. In: Rowson L.E.A. (ed.) *Egg transfer in cattle.* Comission of the European Community, Luxembourg, Eur. 5491.
- Tervit H.R., Rowson L.E.A. & Brand A. 1973. Synchronization of oestrus in cattle using a Prostaglandin F₂ alpha-analogue (ICI-80996). *J. Reprod. Fertil.* 34: 179-181.
- Willet E.L., Black W.G., Casida L.E., Stone W.H. & Bruckner P.J. 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 113:247.

POLUIÇÃO INDUSTRIAL COMO CAUSA DE INTOXICAÇÃO POR FLÚOR EM BOVINOS NO MUNICÍPIO DE RIO GRANDE, RS¹

FRANKLIN RIET-CORREA², JOÃO ALBERTO OLIVEIRA², MARIA DEL CARMEN MÉNDEZ² E ANA LUCIA SCHILD²

ABSTRACT.- Riet-Correa F., Oliveira J.A., Méndez M.C., Schild A.L. 1983. [Industrial pollution as a cause of fluoride intoxication in cattle in the municipality of Rio Grande, southern Brazil.] Poluição industrial como causa de intoxicação por flúor em bovinos no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 3(4): 107-114. Laboratório Regional de Diagnóstico, Fac. Vet., Univ. Fed. Pelotas, 96100 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Fluoride intoxication in cattle occurred as a consequence of atmospheric pollution caused by the industrial effluents of 4 phosphate processing factories located in the city of Rio Grande, state of Rio Grande do Sul. The lesions of the incisor teeth were characterized by a chalky white or brown discoloration, hypoplasia of the enamel, increased attrition and gingival hyperplasia. Such lesions were studied in animals from 19 farms located in a range of 4.5 to 17.5 km from the factories. The severity of the lesions was related to the distance between the farms and the factories as a linear function [$Y = 2.13 + (-0.12 \cdot x)$; $r^2 = 0.77$ ($P < 0.001$)]. Molar and premolar teeth showed excessive and uneven attrition. In a farm located 6 km from the factories, 2 cows showed lameness and 1 had hyperostosis of the metatarsal bones. Histological lesions of the permanent incisor teeth were hyperplasia of the cement and disturbed incremental lines and hypocalcification of the dentine. Bone lesions were characterized by osteoporosis with degeneration and atrophy of osteoblasts. Numerous cementing lines and retention of the chondroid core were observed, indicating arrested osteocytic osteolysis and chondrolysis. In compact bone, osteons were irregular in shape, size and distribution with enlarged Haversian canals and irregular distribution of osteocytes; interstitial lamellae were increased and irregular. It is considered that the lesions of osteofluorosis are due to an imbalance between bone apposition and resorption; osteoporosis would be a result of the alterations observed in osteoblasts which were apparently more severely affected than osteocytes. Fluoride levels, determined in the epifise-metáfise of the humerus of 3 animals and in the mandibles of 7 belonging to two properties situated between 5 and 6 km from the factories, varied between 1,400 ppm and 5,750 ppm of ash. This paper points out the potential risks of fluoride contamination by the human population of the city of Rio Grande, where the fosfate processing factories are situated.

INDEX TERMS: Cattle, fluoride, fluorosis, fluoride poisoning, environmental pollution, osteoporosis.

SINOPSE.- Descreve-se intoxicação por flúor, em bovinos, como consequência da poluição atmosférica produzida por fábricas de adubo que processam rocha fosfática, localizadas na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul. As lesões dos incisivos caracterizaram-se por manchas esbranquiçadas com aspecto de giz, pigmentação marrom, hipoplasia do esmalte, desgaste dentário exagerado e hiperplasia da gengiva. Tais lesões foram estudadas em 19 estabelecimentos localizados entre 4,5 e 17,5 km de distância das fábricas de adubo, determinando-se uma função linear do grau das lesões com relação à distância.

[$Y = 2,13 + (-0,12 \cdot x)$; $r^2 = 0,77$ ($P < 0.001$)]. Os molares e pré-molares apresentaram desgaste excessivo e irregular. Em um estabelecimento, localizado a 6 km das fábricas, foram observadas lesões de hiperostose em um animal, e claudicação em dois. Histologicamente as lesões dentárias foram caracterizadas por hiperplasia do cimento assim como distúrbios das linhas incrementais e hipocalcificação da dentina. As lesões ósseas consistiram em osteoporose com atrofia e degeneração dos osteoblastos; foram observadas também retenção da corda condróide e presença de linhas cimentantes, evidenciando uma inibição da condrólise e osteólise osteocítica. No osso compacto, os sistemas de Havers apresentavam-se irregulares em seu tamanho, forma e distribuição, os canais de Havers estavam aumentados de diâmetro e os osteócitos irregularmente distribuídos dentro do sistema; as lamelas intersticiais estavam aumentadas e irregulares. Considera-se que as alterações ósseas foram produzidas por um desequilíbrio entre a aposição e a

¹ Aceito para publicação em 19 de maio de 1983.

Trabalho financiado pelo CNPq e a EMBRAPA/UEPAE Pelotas.

² Laboratório Regional de Diagnóstico, Convênio EMBRAPA/UFPel, Faculdade de Veterinária, UFPel, 96100 Pelotas, Rio Grande do Sul.

reabsorção óssea. A osteoporose teria ocorrido como consequência das lesões dos osteoblastos, os quais foram aparentemente mais afetados que os osteócitos. Os níveis de flúor, determinados em 7 mandíbulas e 3 úmeros de animais pertencentes a dois estabelecimentos situados entre 5 e 6 km das fábricas, variaram entre 1.400 e 5.750 ppm. Alerta-se para os riscos de saúde, pela contaminação por flúor, a que estão expostos os habitantes da cidade de Rio Grande, onde se localizam as fábricas processadoras de rocha fosfática.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bovinos, flúor, fluorose, intoxicação por flúor, poluição ambiental, osteoporose.

INTRODUÇÃO

A intoxicação por flúor é uma doença caracterizada por alterações dentárias e ósseas. Aquelas caracterizam-se por hipoplasia do esmalte, manchas esbranquiçadas com aspectos de giz ou manchas de cor marrom, porosidade e desgaste exagerado (Suttie 1977, Krook & Maylin 1979, Shupe 1980). As alterações ósseas são suscetíveis de variação, podendo observar-se osteoporose (osteopenia), osteopetrose (osteoesclerose) ou hiperostose (Obel & Erne 1971, Krook & Maylin 1979, Shupe 1980).

A espécie bovina é a mais sensível à intoxicação por flúor. Trabalhos experimentais evidenciaram que a dose tóxica seria de 30 a 40 ppm na alimentação (Shupe 1980, Suttie 1980), enquanto que estudos de surtos espontâneos indicam que quantidades menores podem causar intoxicações graves (Krook & Maylin 1979, Hillman et al. 1979). São quatro as mais importantes fontes de excessiva quantidade de flúor para os animais (Shupe 1980): a) pastagens contaminadas pela emissão de flúor de diversos tipos de indústrias; b) água com alto conteúdo de flúor; c) suplementos minerais que não tenham sido apropriadamente desfluorizados; d) vegetação que cresce em solos com alto conteúdo de flúor.

A poluição atmosférica por flúor é causada por diversos tipos de indústrias (Suttie 1977): a) processamento de rocha fosfática para produção de adubo; b) indústria de alumínio; c) indústria de aço e ferro; d) produção de tijolos e cerâmica; e) combustão de carvão mineral para diversos fins.

O objetivo do presente trabalho foi o de estudar a ocorrência de intoxicação por flúor em bovinos criados em áreas onde funcionam indústrias de processamento de rocha fosfática para produção de adubo, no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

A ocorrência e frequência de lesões dentárias foram estudadas em visitas realizadas a 19 estabelecimentos. A área afetada foi determinada observando-se animais de estabelecimentos situados a distâncias crescentes de quatro indústrias que processam rocha fosfática para produção de adubo, localizadas na área urbana da cidade de Rio Grande. Em cada estabelecimento observou-se um número variável de bovinos, de diferentes idades, em um máximo de 29, anotando-se a presença de lesões dentárias dos incisivos permanentes, os quais eram fotografados em preto e branco. Uma vez reveladas as fotografias, e com as anotações realizadas

durante as observações dos animais, era determinado o grau de lesão de cada dente incisivo permanente. Para isso foi utilizada a seguinte escala de graus, adaptada de Suttie (1977): grau 0, sem lesão; grau 1, presença de pontos de cor marrom no esmalte ou manchas amarelas difusas ou manchas brancas discretas; grau 2, pontos marrons difusos no esmalte, grandes áreas com manchas brancas opacas com aspecto de giz ou manchas marrons; grau 3, hipocalcificação ou erosão do esmalte e manchas marrons ou brancas difusas, desgaste evidente; grau 4, lesões similares ao grau anterior, mas com desgaste acentuado e exposição de dentina.

A intensidade das lesões com relação à distância das indústrias implicadas foi estudada por análise de regressão, tomando como variável independente a distância e como variável dependente o grau médio por estabelecimento. Esse grau médio foi determinado pela média dos graus de cada incisivo. A presença de lesões nos molares e pré-molares foi observada após o abate, em três animais do estabelecimento A.

Para o estudo histológico foram coletados, no momento do abate, dentes incisivos junto com a porção incisiva e uma parte do espaço intermandibular da mandíbula de sete animais, pertencentes aos estabelecimentos A e H, de idade variável entre 3,5 e 5 anos. Dentes permanentes, já erupcionados ou ainda retidos, e cortes transversais da mandíbula no espaço intermandibular foram fixados em formol a 10%, descalcificados a vácuo em ácido fórmico e citrato de sódio (Luna 1968), incluídos em parafina, cortados a 6 micras e corados pela técnica de hamatoxilina-eosina. Cortes longitudinais da epífise-metáfise e transversais da diáfise do úmero direito, de três dos animais anteriormente mencionados, foram processados de igual forma que os dentes e osso mandibular.

O conteúdo de flúor da mandíbula, dos sete animais anteriormente mencionados, e da epífise-metáfise proximal do úmero de três deles, foi determinado na Universidade de Cornell pela técnica descrita por Krook & Maylin (1979).

RESULTADOS

Lesões dentárias

O esmalte apresentava, em sua coloração, alterações caracterizadas por pontos marrons do tamanho aproximado de uma cabeça de alfinete, manchas amarelas ou marrons, manchas brancas opacas com aspecto de giz. Outra alteração observada foi a hipoplasia do esmalte, caracterizada geralmente por estrias transversais. Em alguns casos, toda a superfície dentária era irregular e porosa, enquanto que em outros a dentina estava exposta, apresentando-se de cor marrom escura. (Fig. 1 e 2)

Muitos animais mostraram um acentuado desgaste dentário, observando-se dentes com exposição da polpa dentária. Esse desgaste era mais evidente quando alguns incisivos eram mais afetados que outros do mesmo animal. As lesões dentárias eram geralmente simétricas. A gengiva marginal apresentava-se hiperplásica e, em alguns animais, observava-se perda de dentes.

No Quadro 1, apresentam-se os dados dos estabelecimentos estudados, com relação à distância das indústrias processadoras de rocha fosfática, grau médio das lesões por estabelecimentos, percentagem de animais com lesão e número de incisivos observados segundo o grau da lesão apresentada.

Na Figura 3 apresenta-se um mapa da região, com a localização das fábricas de adubo e dos estabelecimentos estudados.

Na Figura 4 apresentam-se os resultados da análise de regressão do grau de lesão por estabelecimento, em função da distância das fábricas produtoras de adubo.

Nos três animais do estabelecimento A, nos quais foram observados os molares e pré-molares, verificou-se desgaste exagerado e irregular (Fig. 5 e 6).

POLUIÇÃO INDUSTRIAL COMO CAUSA DE INTOXICAÇÃO POR FLUÓR

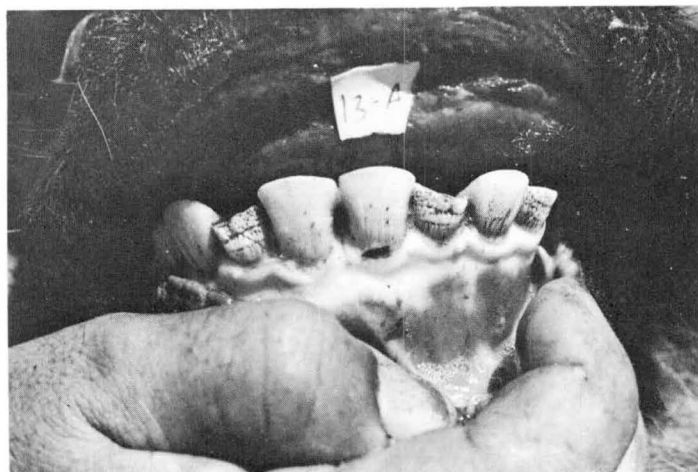


Fig. 1. Dentes incisivos de bovino do estabelecimento A. O grau de lesão de cada dente foi de: 2-2-4-2-2-4-2-4. Observa-se marcada hiperplasia da gengiva.



Fig. 2. Dentes incisivos de bovino do estabelecimento H. O grau de lesão de cada dente foi: 4-3-4-3-3-4-3-3.

Quadro 1. Estabelecimentos, distâncias das fábricas de adubo, número de incisivos observados clinicamente com os diferentes graus de lesão, grau médio por estabelecimento e prevalência de animais com lesão

Estab.	Distância km	Nº de dentes por grau de lesão					Grau médio	Bovinos com lesão ^(a)	Bovinos sem lesão	Prevalência %
		0	1	2	3	4				
P	17,5	86	2	0	0	0	0,023	2	13	13,3
J	14,5	91	3	5	4	0	0,24	7	8	46,7
R	13	32	5	3	0	0	0,27	5	9	35,7
S	14	18	1	1	1	0	0,28	3	7	30,0
O	13	121	24	17	3	0	0,41	16	7	69,5
T	15	24	2	3	2	0	0,45	4	2	66,6
Q	17	31	4	6	1	0	0,45	4	5	44,4
K	11	76	12	20	2	0	0,53	12	5	70,6
L	11	101	34	24	0	6	0,64	22	1	95,7
D	8	23	19	11	0	0	0,77	13	1	92,8
M	15	94	21	26	9	5	0,77	23	6	79,3
F	9,5	36	19	17	0	1	0,78	16	1	94,1
I	10	31	17	17	2	0	0,85	13	4	76,5
N	12	41	5	9	6	5	0,92	8	2	80,0
B	7,5	14	7	18	1	0	1,15	9	0	100,0
G	8,5	7	6	11	0	0	1,17	7	0	100,0
C	4,5	2	4	16	0	0	1,64	4	0	100,0
H	6	15	17	19	16	4	1,68	9	0	100,0
A	5,5	8	12	106	9	9	1,99	25	0	100,0

^(a) Os animais dos estabelecimentos I e K eram de raça Hereford e cruzas, os restantes eram da raça Holandesa.

Outras alterações clínicas

No estabelecimento H foi observado um animal com hiperostose dos ossos metacarpianos, e dois animais com claudicação caracterizada por marcha com movimentos limitados e rigidez dos membros anteriores.

Alterações histológicas

Ossos. Os cortes longitudinais da epífise e metáfise do úmero mostraram, em 2 dos 3 animais estudados, acentuada osteoporose (Figs. 7, 8 e 9); no terceiro, essa lesão era mais discreta. O osso subcondral apresentava escassa formação de esponjosa primária com uma marcada redução, e em alguns casos, ausên-

cia de osteoblastos (Fig. 9). Um animal apresentava hemorragias subcondrais nessa região. Nas trabéculas da esponjosa secundária e de outras áreas das metáfises e epífises, observava-se retenção da corda condróide, discreto aumento de linhas cimentantes e osteoblastos achatados, atróficos e inativos (Fig. 10).

Nos ossos mandibulares dos animais afetados, notava-se um número variável de linhas cimentantes, evidenciando inibição da osteólise osteocítica. Essas linhas, quando numerosas, davam ao corte o aspecto de mosaico (Fig. 11). Os sistemas de Havers apresentavam-se marcadamente irregulares em seu tamanho, forma e distribuição (Fig. 11); os canais de Havers es-



5



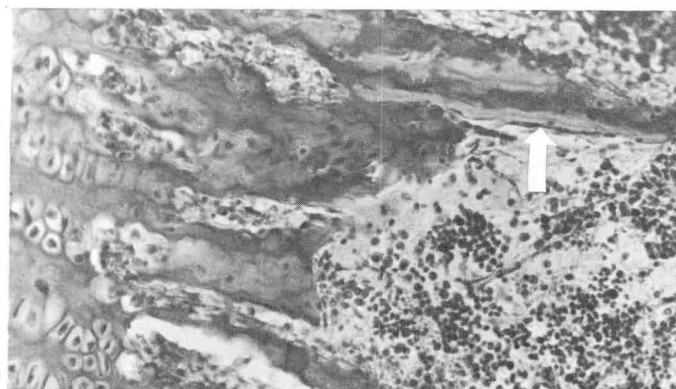
6



7



8



9



10

Fig. 5. Dentes premolares e molares de bovino do estabelecimento A, de 4 anos de idade, mostrando desgaste acentuado e irregular.

Fig. 7. Osso subcondral da epífise proximal do úmero, de bovino do estabelecimento A, mostrando marcada osteoporose. H.-E. Obj. 4.

Fig. 9. Cartilagem epifisária e esponjosa primária do úmero de bovino do estabelecimento A. Podem observar-se osteoblastos atróficos (seta) e ausência de osteoblastos, com escassa formação de trabéculas ósseas. H.-E. Obj. 10.

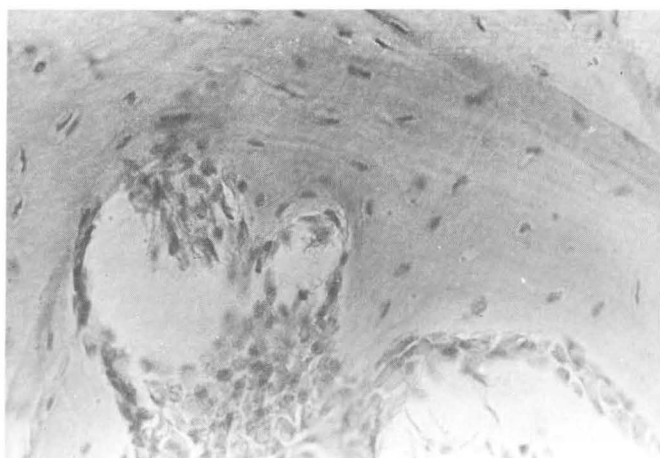
Fig. 6. Dentes premolares e molares de bovino normal de 4 anos de idade.

Fig. 8. Osso subcondral da epífise proximal do úmero de bovino normal. H.-E. Obj. 4.

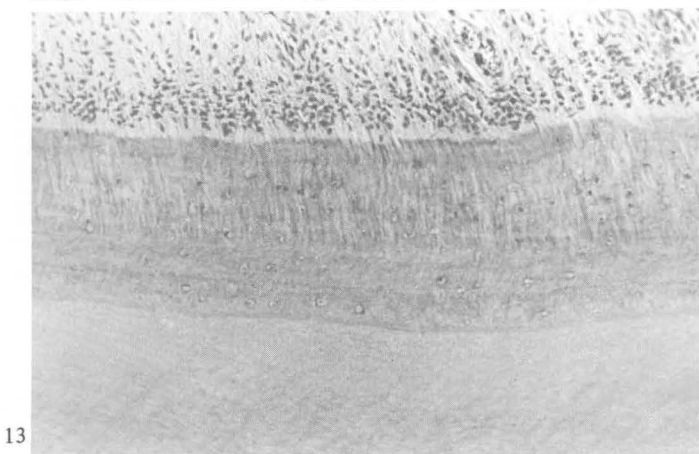
Fig. 10. Trabécula óssea da metáfise proximal do úmero de bovino do estabelecimento A, mostrando retenção da corda condróide no centro da trabécula e osteoblastos achatados e atróficos (seta). H.-E. Obj. 20.



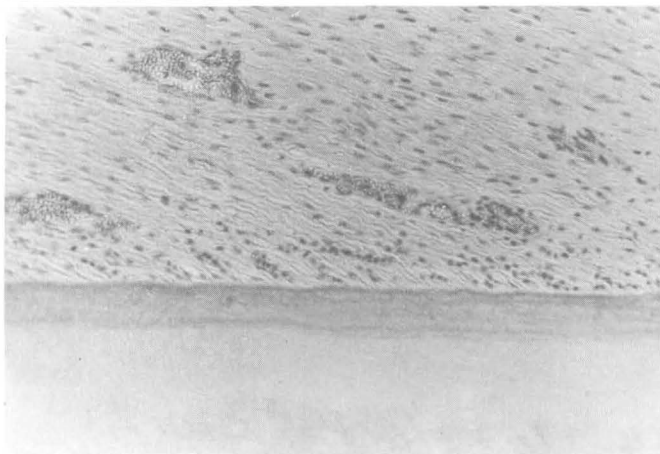
11



12



13



14

Fig. 11. Numerosas linhas cimentantes e irregularidade nos sistemas de Havers na mandíbula. Bovino do estabelecimento A. H.-E. Obj. 10.

Fig. 13. Hiperplasia do cimento, com presença de numerosos cementócitos na altura do terço superior da raiz de um dente incisivo. Bovino do estabelecimento H. H.-E. Obj. 10.

Fig. 12. Osteoblastos distribuídos em várias camadas na mandíbula. Bovino do estabelecimento A. H.-E. Obj. 20.

Fig. 14. Corte histológico de dente incisivo de bovino normal, à mesma altura que o da Fig. 13. H.E. Obj. 10.

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho, no que se refere à presença de lesões dentárias e ósseas e determinação de flúor nos ossos, confirmam a ocorrência de intoxicação crônica por flúor. Dentre as indústrias que funcionam na cidade de Rio Grande, destacam-se quatro que processam rocha fosfática para produção de adubo, com produção aproximada de 2 milhões de toneladas durante o ano de 1981. Como já foi mencionado, o processamento de rocha fosfática é uma das principais fontes de poluição atmosférica por flúor, podendo causar intoxicação nos bovinos pela ingestão de pastagens contaminadas.

As lesões dentárias observadas são características da fluorose dentária (Shupe 1980). Essas lesões são induzidas pela ação do flúor sobre os ameloblastos, os quais produzem uma matriz alterada na qual não acontece o processo normal de calcificação e, em consequência, o esmalte está hipoplásico, falta em algumas partes e sofre um processo exagerado de desgaste (Suttie 1977). Após a erupção dentária, a ingestão de flúor tem muito pouco efeito sobre os dentes (Shupe 1980). A pig-

mentação do esmalte ocorreria pela oxidação da matriz orgânica alterada (Shupe et al. 1963). A hiperplasia do cimento atuaria como um mecanismo de reparação das lesões do esmalte (Shearer et al. 1978).

Em consequência da inexistência de identificação dos animais, nos estabelecimentos estudados, não puderam ser avaliadas possíveis alterações relativas à idade da erupção dentária. Com relação a esse ponto, Krook e Maylin (1979) constataram retardo de 1 a 3 anos na erupção dos incisivos permanentes, em animais intoxicados com flúor em condições não controladas.

A hiperplasia da gengiva é explicada pela excessiva mobilidade dos dentes, conseqüente às alterações do osso alveolar (Krook & Maylin 1979), o que também explicaria a perda de alguns dentes.

Através do estudo da área geográfica afetada pela intoxicação, observa-se que o grau de fluorose dentária depende, em grande parte, da distância entre os estabelecimentos e as fábricas produtoras de adubo, podendo ser encontradas alterações dentárias conseqüentes à poluição ambiental em uma área de aproximadamente 17 km de distância das fontes de poluição.

Um fator que pode modificar a área afetada pela poluição e, em consequência, a dose de flúor ingerida pelos animais, é a direção e frequência dos ventos. Todos os estabelecimentos estudados neste trabalho situam-se a oeste e sudoeste das fábricas de adubo, sendo afetados pela poluição quando os ventos sopram de leste e nordeste, o que ocorre em 12% e 26% do tempo, respectivamente (FURG 1979). Outros fatores que determinam a toxicidade do flúor, além da dose e duração de ingestão, são o nível de nutrição, o estresse ou o estado sanitário dos animais, a exposição a outros agentes que podem exercer sinergismo ou diminuir os efeitos do metalóide, e a formulação química do flúor ingerido (Shupe 1980, Suttie 1980).

Com relação ao desgaste dos molares, observado só em três animais abatidos por ser muito difícil a inspeção desses dentes em animais vivos, cabe destacar que é uma lesão que está associada a alterações graves dos incisivos 1, 2 e 3 (Shupe 1980), o que foi frequentemente observado nos estabelecimentos mais próximos das fábricas.

Como foi proposto por Krook e Maylin (1979), a interpretação da patogenia das lesões ósseas será realizada aceitando-se que a osteólise osteocítica é o principal modo de reabsorção óssea. A principal lesão observada nestes casos foi a osteoporose, acompanhada de acentuada degeneração e ausência de osteoblastos. Simultaneamente, foram observadas retenção da corda condróide e numerosas linhas cimentantes, que evidenciam inibição da condrólise e osteólise osteocítica.

Segundo Krook e Maylin (1979), o grau de intoxicação seria o que determina o tipo de lesão óssea encontrada; uma intoxicação moderada causaria osteopetrose e hiperostose como consequência de inibição da osteólise osteocítica com pouca interferência na aposição. Por outro lado, uma intoxicação um pouco mais acentuada lesaria também os osteoblastos, produzindo osteopetrose sem hiperostose, e, finalmente, uma intoxicação grave causaria osteonecrose e lesão dos osteoblastos, levando a uma osteoporose.

As lesões ósseas observadas neste trabalho não se enquadram em nenhuma dessas alternativas, já que se observou osteoporose sem evidências de osteonecrose. Como foi mencionado anteriormente, observam-se dois fatos que levam a consequências diferentes; a lesão osteoblástica, que diminui a aposição óssea, produzindo osteoporose, e a inibição de osteólise e condrólise osteocítica, que levaria a uma osteopetrose por diminuição da reabsorção. A osteoporose teria ocorrido em consequência de que a lesão sobre os osteoblastos é mais grave que a lesão sobre os osteócitos. Obel e Erne (1971) também observaram osteoporose com insuficiência osteoblástica e sem osteonecrose em um animal, enquanto outros bovinos estudados por eles apresentaram osteopetrose. Esses autores consideram a osteoporose como uma lesão mais grave que a osteopetrose.

Essa ação variável e simultânea sobre a aposição e a reabsorção óssea seria também responsável pela desorganização dos sistemas de Havers observada nos cortes de mandíbula, alteração que é frequentemente encontrada na intoxicação por flúor (Shupe 1980). Outro fato que deve ser discutido é a baixa frequência de hiperostose, lesão que foi observada somente no estabelecimento H, onde os animais apresentaram severas

lesões dentárias; segundo Shupe (1980), a hiperostose seria uma indicação de fluorose grave, já que em trabalhos experimentais ocorreu somente em animais que estavam ingerindo doses altas de flúor. Contrariamente, Krook e Maylin (1979) descrevem alterações ósseas e dentárias, com marcada influência na saúde dos animais, sem presença de hiperostose. Os fatos discutidos anteriormente evidenciam que a patogenia das diferentes lesões ósseas encontradas na intoxicação por flúor, caracterizada pela ação variável do metalóide sobre os diferentes componentes do tecido ósseo, não está ainda bem esclarecida. Cabe destacar que, no presente trabalho, nenhum dos animais utilizados para o estudo histológico apresentava lesões clínicas de hiperostose.

Resulta difícil analisar as perdas econômicas causadas pela intoxicação por flúor na região estudada, principalmente porque em nenhum dos estabelecimentos existiam registros de produção e reprodução. A observação dos níveis de flúor em ossos, apesar de confirmar a ocorrência da intoxicação, não permite determinar a gravidade desta. Isso porque, considerando a evidente variação detectada entre os diferentes ossos, e as diferentes idades (Greenwood et al. 1964), seria necessário realizar maior número de determinações em vários estabelecimentos. Por outro lado, em casos de intoxicação em condições não experimentais, a detecção de flúor nos ossos não é um indicativo totalmente eficiente para avaliar o grau de intoxicação (Krook & Maylin 1979, Hillman et al. 1979).

Greenwood et al. (1964), em estudos experimentais com bovinos de leite, utilizando diferentes doses de flúor por um período de 7 anos, observaram perdas na produção de leite quando os animais ingeriram doses de 49 ppm e 93 ppm; porém, esses efeitos eram precedidos por claudicações e lesões de hiperostose. Por outro lado, Krook e Maylin (1979) descreveram severas perdas econômicas ocasionadas principalmente pelo acentuado retardo no crescimento, diminuição na produção de leite, alta mortalidade neonatal e necessidade de eliminar as vacas após a segunda ou terceira cria, sem que sejam observados casos de hiperostose e com lesões dentárias similares às observadas neste trabalho, nos estabelecimentos mais próximos às fábricas. Esses autores argumentam que as perdas econômicas nos casos de doença espontânea são mais importantes que as observadas nos experimentos mencionados anteriormente; isso porque os experimentos foram iniciados em animais de 3 a 4 meses, enquanto que nos casos espontâneos a exposição ao flúor se iniciaria no útero e nos primeiros meses de vida, que são as etapas mais críticas para o crescimento.

Um fator que deve ser considerado é a presença de outros elementos que poderiam estar somando sua ação à do flúor, já que estudos realizados pela Universidade de Rio Grande detectaram altos níveis de cobre, mercúrio, chumbo, fenóis e sulfetos na área estudada neste trabalho (Aveline 1979). Essa participação de outros elementos na ocorrência de lesões clínicas e perdas econômicas tem sido observada na região de Candiota, Rio Grande do Sul, onde funciona uma usina para produção de energia elétrica mediante a combustão de carvão mineral. Nessa região, apesar dos níveis de flúor serem consideravelmente mais baixos que em Rio Grande, as perdas econômicas são muito importantes, em consequência do marcado

desgaste dentário, que poderia estar ocorrendo devido a dois fatores: a diminuição da resistência do esmalte como consequência da ingestão de flúor, e o efeito abrasivo dos diversos elementos eliminados com o efluente da combustão de carvão, dos quais o mais importante pareceria ser o silício (Oliveira et al. 1982).

Apesar das dificuldades expostas para analisar as perdas econômicas causadas pela intoxicação por flúor na região de Rio Grande, pareceria evidente que, pelo menos nos estabelecimentos mais afetados, os prejuízos são importantes. Essas perdas são evidentes pelo aparecimento de lesões dentárias graves, que interferem na apreensão e mastigação dos alimentos (Krook & Maylin 1979, Shupe 1980), e pelas lesões ósseas, que obviamente produzem um retardo no crescimento.

Cabe destacar que, neste estudo, não foram observados animais das áreas mais próximas das fábricas, áreas que foram desapropriadas para a instalação do distrito industrial de Rio Grande.

O fato de que as fábricas de adubo estão localizadas mais próximas da cidade de Rio Grande do que da área abrangida por este trabalho evidencia a necessidade de levar em consideração as consequências da poluição por flúor e outros elementos na população humana. Nesse ponto, devemos considerar o efeito aditivo das várias fontes de flúor, que isoladamente não causariam transtornos, tais como: água, vegetais contaminados pela poluição ambiental, inalação de flúor da atmosfera ou leite de vacas da área onde ocorre a intoxicação.

Todos esses fatores devem ser analisados considerando que existe tendência a aumentar a gravidade do problema exposto, já que as indústrias processadoras de rocha fosfática têm relativamente pouco tempo de funcionamento e que têm aumentado constantemente sua produção durante os últimos anos. Como a intoxicação por flúor tem efeito acumulativo, as consequências desse aumento progressivo deverão ser sentidas dentro de alguns anos. As mesmas considerações podem ser feitas com relação a outras indústrias que estão sendo instaladas atualmente no distrito industrial de Rio Grande, principalmente aquelas que vão utilizar carvão mineral, aumentando a contaminação por flúor e outros elementos.

Outro fator a ser destacado é que a ocorrência da intoxicação passou despercebida por todos os produtores da região. Isso indicaria a possibilidade de ser a fluorose uma doença que ocorra em outras áreas do Brasil onde funcionam indústrias de

alumínio, aço, tijolos e cerâmica, que processem rocha fosfática ou que utilizem carvão para vários fins.

Agradecimentos. - Às Doutoras Lourdes Rota Devildos, Clinéia Campos Langlois e Íria Guimarães Machado, pela colaboração na interpretação histológica das lesões dentárias, aos Doutores Lennart Krook e A. Maylin, pelas determinações de flúor, os autores agradecem.

REFERÊNCIAS

- Aveline A. 1979. Distrito industrial de Rio Grande: avaliação da situação ambiental. *Ciência e Cultura* 31: 1260-1264.
- FURG 1979. Estudo da viabilidade do aproveitamento da energia eólica na região da bacia da Lagoa Mirim. Grupo de Energia Eólica, Depto de Física, Fundação Universidade do Rio Grande (FURG) - SUDESUL. 59 p.
- Greenwood D.A., Shupe J.L., Stoddard G.E., Harris L.E., Nielsen H.M. & Olson L.E. 1964. Fluorosis in cattle. Special report nº 17, Agric. Exp. St., Utah State University, Logan. 36 p.
- Hillman D., Balenbaugh D.L. & Convey E.M. 1979. Hypothyroidism and anemia related to fluoride poisoning in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 62: 416-423.
- Krook L. & Maylin G.A. 1979. Industrial fluoride pollution. Chronic fluoride poisoning in Cornwall Island cattle. *Cornell Vet.* 69 (Suppl. 8): 1-70.
- Luna L.G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. McGraw Hill, New York. 258 p.
- Obel A.L. & Erne K. 1971. Bovine fluorosis in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 12: 164-184.
- Oliveira J.A., Riet-Correa F., Méndez M.C. & Schild A.L. 1982. Lesões dentárias em bovinos e ovinos causadas por poluição ambiental na região de Candiota, RS. *Anais XVIII Congr. Bras. Med. Vet. Camboriú*, p. 295.
- Shearer T.R., Kolstad D.L. & Suttie J.W. 1978. Bovine dental fluorosis, histological and physical characteristics. *Am. J. Vet. Res.* 39: 597-602.
- Shupe J.L. 1980. Clinicopathologic features of fluoride toxicosis in cattle. *J. Anim. Sci.* 51: 746-758.
- Shupe J.L., Miner M.L., Greenwood D.A., Harris L.E. & Stoddard G.E. 1963. The effect of fluoride on dairy cattle. II. Clinical and pathological effects. *Am. J. Vet. Res.* 24: 964-979.
- Suttie J.W. 1977. Effects of fluoride on livestock. *J. Occup. Med.* 19: 40-48.
- Suttie J.W. 1980. Nutritional aspects of fluoride toxicosis. *J. Anim. Sci.* 51: 759-766.

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Crotalaria anagyroides* (Leg. Papilionoideae) EM BOVINOS¹

CARLOS HUBINGER TOKARNIA² E JÜRGEN DÖBEREINER³

ABSTRACT.- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1983. [Experimental poisoning of cattle by *Crotalaria anagyroides* (Leg. Papilionoideae).] Intoxicação experimental por *Crotalaria anagyroides* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 3(4): 115-123. Depto Nutrição Animal, Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, RJ 23460, Brazil.

Symptoms of toxicity were observed in calves fed fresh aerial parts of the plant *Crotalaria anagyroides* collected in the State of Rio de Janeiro. Plant material was given during periods ranging from 1 to 12 days, the amount consumed by each animal varying from day to day. The plant was not well eaten and the original plan of giving it as the only food could not be adhered to. In most experiments plant material was mixed with small amounts of chopped grass, concentrate ration and molasses; at times it was necessary to place the plant in the mouth of the animals. The amounts eaten varied from 6700 g (55.8 g/kg) eaten by one animal on one day, to 55400 g (294.8 g/kg) eaten by another animal over 12 days. Two animals received only the leaves and thin stems, two others only the flowers and green and ripe pods, and the last two, all aerial parts (leaves, thin stems, flowers and green and ripe pods). All calves suffered the toxic effects of the plant. Five of the six calves had clinical symptoms of poisoning, while the sixth showed only histopathologic lesions. Symptoms of poisoning were first seen between 38 days and 9 months and 8 days after the first day of ingestion of the plant, until which time the animals were apparently healthy and in good nutritional state. Symptoms consisted mainly of a lack of appetite and weight loss, over weeks or months (3/5) and/or nervous symptoms as excitation (2/5) or depression (1/5) which lasted for days. Two animals also had abdominal contractions of short duration. Two animals died, 11 days and 35 days after the onset of symptoms, one was euthanized *in extremis*, after 9 days of disease, and another was euthanized in bad nutritional state, after 4 months of disease. Only one animal recovered clinically, having shown symptoms for six months and then regaining weight. It was euthanized together with the sixth bovine which had never shown symptoms of poisoning. The most important post-mortem finding was cirrhosis: the liver was hard, pale and had a lobular, granular or nodular aspect. The most important histopathological changes were the presence of collagen, proliferation of fibroblasts and of the epithelial cells of the bile ducts, megalocytosis and the presence of nodules of regeneration in the liver; in two animals spongy degeneration in the central nervous system. Attention is drawn to the fact that no case histories have been obtained or observations made that incriminate *Crotalaria anagyroides* as the cause of spontaneous disease in cattle, and it is believed that this would hardly happen because of the bad palatability of the plant.

INDEX TERMS: Poisonous plants, *Crotalaria anagyroides*, Leguminosae Papilionoideae, experimental plant poisoning, cattle.

SINOPSE.- Em experimentos em que as partes aéreas de *Crotalaria anagyroides* frescas, recém-colhidas na área do Km 47, Seropédica, município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, foram administradas por via oral a seis bovinos jovens desmamados, a planta demonstrou ser tóxica para essa espécie

animal. As folhas e talos finos, as inflorescências e vagens ou todas as partes juntas foram dadas aos animais em quantidades que variaram de 6700 g (55,8 g/kg) em um dia até 55400 g (294,8 g/kg) em 12 dias. Todas as partes da planta se revelaram tóxicas. Cinco dos seis bezerros mostraram sintomas de intoxicação; o sexto mostrou a ação tóxica da planta somente através de lesões histopatológicas. Os sintomas apareceram de 38 dias a 9 meses e 8 dias após a ingestão da planta, mantendo-se os animais até então aparentemente sadios e em bom estado de nutrição; consistiram principalmente em anorexia e emagrecimento durante semanas a meses (3/5) e/ou sintomas nervosos sob forma de excitação (2/5) ou depressão (1/5) durante período mais curto (dias). Dois animais tiveram também contra-

¹ Aceito para publicação em 29 de abril de 1983.

² Departamento de Nutrição Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, RJ 23460; bolsista do CNPq (1111.5010/76).

³ Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, EMBRAPA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23460.

ções abdominais. Dois animais morreram após 11 e 35 dias de doentes, um foi sacrificado *in extremis* após 9 dias doente, e outro foi sacrificado em estado de nutrição precário após 4 meses doente. Só um animal se recuperou clinicamente e engordou, após 6 meses de sintomatologia; esse bovino foi sacrificado junto com o que nunca tinha mostrado sintomas de intoxicação. O achado de necropsia mais importante foi cirrose hepática: o fígado era mais duro, tinha coloração alaranjada clara e aspecto lobular, granular ou até nodular. Os achados histopatológicos mais importantes foram presença de tecido colágeno, proliferação de fibroblastos e das células epiteliais das vias biliares, megalocitose e a presença de nódulos de regeneração no fígado; em dois animais foi constatada degeneração esponjosa no sistema nervoso central.

Uma vez que não foram obtidos históricos nem feitas observações que *Crotalaria anagyroides* tenha sido a causa de doença espontânea em bovinos, é externada a opinião que em virtude da má palatabilidade, que durante os experimentos a planta demonstrou possuir, isto dificilmente poderá acontecer.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, *Crotalaria anagyroides*, Leguminosas, intoxicações por planta, bovinos, patologia.

INTRODUÇÃO

Em revisão recente sobre crotalárias tóxicas, vimos que tem sido verificado que numerosas espécies deste gênero são tóxicas para animais domésticos; estas constatações foram feitas principalmente na África do Sul, nos Estados Unidos da América do Norte e na Austrália (Tokarnia & Döbereiner 1982). No Brasil têm sido assinaladas aproximadamente 40 espécies de *Crotalaria* (32 constam da Flora Brasiliensis). As espécies mais comuns são *Crotalaria mucronata* (sin. *Crotalaria striata* DC.), *C. vitellina* Kerr. e *C. anagyroides* H.B.K. (Barroso 1974, comunicação pessoal). Sobre a toxidez destas, encontramos dados na literatura somente em relação a *C. mucronata*; como eles eram escassos, estudamos essa espécie e comprovamos sua toxidez para bovinos (Tokarnia & Döbereiner 1982). Quando ingerida em doses únicas de 60 e 80 g/kg, as folhas frescas de *C. mucronata* causaram um quadro agudo de intoxicação, finalizando com a morte dos animais; excepcionalmente elas tiveram efeito letal na dose de 25 g/kg, em um bovino. Os sintomas mais evidentes nos três animais que morreram, foram tremores musculares. Os achados de necropsia, nos dois bovinos que ingeriram 60 e 80 g/kg, salvo o cheiro forte da planta macerada que o cadáver exalava, foram negativos, e no bovino que ingeriu 25 g/kg, hidrotórax e edema pulmonar acentuados. Os exames histopatológicos não revelaram alterações consistentes. Quantidades pequenas das folhas frescas recém-colhidas administradas repetidamente (doses diárias de 2,5, 5 e 10 g/kg durante 120, 60 e 30 dias, sempre até completar 300 g/kg), não causaram sintomas de intoxicação. As inflorescências e os frutos verdes recém-colhidos, administrados de uma única vez na quantidade de 60 g/kg, não provocaram sintomas. Pela dessecação as folhas perderam a maior parte de sua toxicidade. Concluiu-se naquele trabalho ser pouco provável ocorrerem casos de intoxicação espontânea por *Crotalaria mucronata*

em bovinos no Brasil devido a ser relativamente baixa sua toxicidade, a não se ter verificado a ingestão espontânea da planta por bovinos e a não se ter obtido dados que permitissem suspeitar dessa planta como causa de intoxicação.

Em virtude da importância das leguminosas na fixação de nitrogênio atmosférico, mas por outro lado sabendo-se da toxidez de algumas delas, é muito importante que, antes de estudar uma leguminosa em seus diversos aspectos relacionados com a alimentação animal, se verifique sua eventual toxidez. Em outros países cometeram-se, no passado, erros graves pela omissão desse passo na avaliação da utilidade de leguminosas como alimento. Plantas com alto valor nutritivo, boa capacidade de fixação biológica de nitrogênio, após a sua propagação em maior escala começaram a provocar acidentes de toxidez em animais domésticos.

Na área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro é comum *Crotalaria anagyroides* (Fig. 1). Em virtude de não termos encontrado dados sobre a toxidez dessa espécie na literatura, realizamos o presente estudo.



Fig. 1. *Crotalaria anagyroides* (Leg. Pap.) em floração e frutificação. Município de Itaguaí, Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

As partes aéreas de *Crotalaria anagyroides* recém-coletadas, isto é, colhidas sempre no mesmo dia de sua administração, e procedentes da

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Crotalaria anagyroides*

área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, foram administradas a seis bovinos jovens desmamados, com 1 a 2 anos de idade. Destes, dois receberam só as folhas e os talos finos dos 50 cm superiores da planta, dois receberam somente as inflorescências, sementes verdes e maduras, e dois receberam as folhas, os talos finos, as flores e vagens verdes e maduras. Em todos os experimentos, tencionou-se dar sempre a maior quantidade possível da planta por dia, preferentemente como alimento único. Assim os animais, nos dias de administração da planta, sempre a recebiam inicialmente só. Mas, conforme constatamos durante a experimentação, a planta tem má palatabilidade, e para que os animais a ingerissem em maior quantidade, era necessário dá-la picada e misturada com pequena quantidade de melaço, ração ou capim picado; às vezes, tinha-se de colocar a planta manualmente na boca dos animais. Os períodos de administração variaram de 1 a 12 dias, dependendo principalmente da disponibilidade da planta. A planta foi administrada nos meses de maio, julho e setembro.

Os animais eram mantidos em boxes individuais, recebendo, além da planta e dos eventuais acréscimos, água à vontade. Os bovinos eram examinados diariamente durante os períodos de administração da planta e por alguns dias mais, e depois esporadicamente; se adoeciam, eram novamente examinados pelo menos uma vez por dia, com tomada de temperatura e auscultação do coração, pulmão e rúmen. Nos casos de morte fazia-se a necropsia, complementada por exames histopatológicos (H.-E., Sudan III, Mallory).

RESULTADOS

No Quadro 1 encontram-se os principais dados dos experimentos com as partes aéreas de *Crotalaria anagyroides*, realizados em bovinos. Detalhes sobre os experimentos em que os bovinos mostraram sintomas e morreram são fornecidos nos resumos dos protocolos que seguem.

Quadro 1. Experimentos em bovinos com *Crotalaria anagyroides*

Bovino nº	Planta				Sintomas			
	Número de administrações e dose diária g/kg	Data da administração	Quantidade total		Início após começo da ingestão da planta	Evolução e manifestações	Término e lesões	
			g	g/kg				
<i>Experimentos com as folhas</i>								
4200 (22799) ^a	1. 71,2 2. 40,1 3. 64,4	9-11 maio 1979	23200	175,7	Aprox. 8 meses	Aprox. 6 meses (anorexia e emagrecimento)	Recuperou-se e depois foi sacrificado em 17.12.80 em estado de nutrição bom; cirrose hepática	
4205 (22634)	1. 89,4 2. 56,9 3. 26,0 4. 26,0 5. 17,0	17-22 julho 1979	30100	244,5	55 dias	11 dias (sintomas nervosos de depressão)	Morreu – amanheceu morto em 21.9.79; cirrose hepática	
<i>Experimentos com inflorescências e vagens verdes e maduras</i>								
4202 (22727)	55,8	9 maio 1979	6700	55,8	Aprox. 8 meses	Aprox. 4 meses (anorexia e emagrecimento)	Sacrificado em 9.5.80 em estado de nutrição precário; cirrose hepática	
4206 (22725)	1. 38,6 2. 36,4 3. 21,4 4. 46,4	17-20 julho 1979	20000	142,8	9 meses e 8 dias	9 dias (sintomas nervosos de excitação)	Sacrificado em 4.5.80 <i>in extremis</i> ; cirrose hepática	
<i>Experimentos com folhas, inflorescências, vagens verdes e maduras</i>								
4208 (22801)	1. 51,8 2. 14,9 3. 14,9 4. 34,7 5. 19,4 6. 19,4	7. 18,0 8. 18,0 9. 19,4 10. 19,4 11. 35,6 12. 29,0	20 set. – 1º out. 1979	55400	294,8	—	Não adoeceu, sacrificado em 18.12.80 em estado de nutrição bom; cirrose hepática	
4209 (22668)	1. 53,5 2. — 3. 1,4 4. 20,9 5. 11,9 6. 11,9	7. 5,8 8. 5,8 9. 13,2 10. 13,2 11. 20,5 12. 30,2	20 set. – 1º out. 1979	40550	188,3	38 dias	35 dias (anorexia e emagrecimento, no fim sintomas nervosos de excitação)	Morreu em 2.11.79; cirrose hepática

^a Os números em parênteses correspondem ao registro do material para exame histopatológico no Setor de Anatomia Patológica da Unidade de Pesquisa de Patologia Animal da Embrapa.

Experimentos com as folhas e talos finos das pontas

Bovino 4200, macho, mestiço holandês vermelho e branco, com 132 kg, recebeu as folhas e talos finos das pontas de *Crotalaria anagyroides* durante três dias. Comeu em 9.5.79, 9400 g (71,2 g/kg), em 10.5.79, 5300 g (40,1 g/kg) e em 11.5.79, 8500 g (64,4 g/kg), no total de 23200 g (175,7 g/kg). No 1º dia o animal comeu bem a planta, sem ser picada, e sem acréscimos. No 2º e 3º dias não comeu por si; a planta foi colocada na boca do animal. Durante os dias de administração da planta o animal não mostrou sintomas de intoxicação; só exalava forte cheiro da planta macerada. Nos dias 12, 13 e 14.5.79 mostrou leve anorexia, teve o abdômen aumentado de volume, andar arrastado, fezes pastosas. Em 16.5.79 pesava 139 kg, em 12.6.79, 155 kg, em 27.12.79, 254 kg. No início de 1980 o bezerro foi colocado com outros num piquete. Até julho de 1980 houve semanas em que o bezerro comia bem, e semanas em que comia menos, emagrecendo, ficando sem animação. Mas depois aumentou constantemente em peso. Foi sacrificado em 17.12.80 em bom estado de nutrição. — *Achados de necropsia*: fígado ao corte com aspecto granular com pequenos nódulos de até 2 mm de diâmetro. — *Exames histopatológicos* (SAP 22801) revelam, no fígado, discreta proliferação das células epiteliais das vias biliares nos espaços porta, megalocitose leve em intensidade e frequência, ativação das células de Kupffer, grandes áreas em todo parênquima, menos nas áreas na periferia dos lóbulos, em que as células hepáticas estão tumefeitas, mais claras e com seu citoplasma finamente granular, muitas delas contendo gotas hialinas dos mais variados tamanhos, e numerosos nódulos de regeneração.

Bovino 4205, macho, mestiço holandês vermelho e branco, com 123 kg, recebeu as folhas e talos finos das pontas de *C. anagyroides* durante seis dias. Comeu em 17.7.79, 11000 g (89,4 g/kg), em 18.7.79, 7000 g (56,9 g/kg), em 19.7.79, 6400 g (52 g/kg) e em 20.7.79, 2100 g (17 g/kg); em 21.7.79 e 22.7.79 comeu a média diária de 1800 g (14,6 g/kg); ingeriu ao todo 30100 g (244,5 g/kg). A planta foi dada sempre picada no cocho. No 1º dia inicialmente comeu bem a planta sem acréscimos; depois parou de comê-la. Foi então adicionado melaço e concentrado, o animal comendo de novo a planta. No 2º dia inicialmente o animal comeu a planta regularmente sem acréscimos; foi então adicionado melaço e concentrado. No 3º dia só comeu regularmente a planta acrescida de melaço e concentrado. No 4º dia comeu pouco da mistura planta picada, melaço e concentrado; parte da planta foi então dada na boca do animal. Nos 5º e 6º dias comeu mal a mistura planta picada, melaço e concentrado. Durante os dias de administração da planta, estendendo-se um pouco além, o animal mostrou algumas perturbações digestivas, isto é, no 4º dia do experimento, 20.7.79, o animal eliminou fezes líquidas, nos 5º e 6º dias fezes pastosas líquidas, no 7º dia do experimento, isto é, em 23.7.79, fezes moles e no 8º dia fezes normais. Não mostrou outros sintomas neste período. A partir de 10.9.79 começou a mostrar anorexia variável, e a partir de 12.9.79 teve constantes contrações abdominais e tinha andar cambaleante; a partir de 16.9.79, sempre continuando com as contrações abdominais, ficava às vezes com a cabeça encostada na parede, meio sonolento; a partir de 19.9.79 as fezes eram pastosas. Amanheceu morto em 21.9.79. — *Achados de necropsia*: na cavidade abdominal, presença de grande quantidade (aprox. 10 l), na pleura e no pericárdio de pequena quantidade, de líquido de cor citrea. Edema de todo o mesentério, da serosa do intestino delgado, do intestino grosso e do rúmen no local adjacente ao baço; fígado com superfície levemente irregular e de coloração bem mais clara que o normal, duro ao corte; sua superfície de corte com coloração alaranjado-clara e com aspecto lobular. Coagulador com edema muito acentuado de suas pregas. No reto presença de fezes ressequidas. — *Exames histopatológicos* (SAP 22634) revelam, no fígado, presença de moderada a grande quantidade de colágeno nos espaços porta e sob forma de focos e feixes mais grossos ou mais finos dentro dos lóbulos, subdividindo-os, e em menor quantidade entre as trabéculas e células hepáticas (Fig. 2 e 3), com presença de pequena quantidade de fibroblastos, e acompanhada de leve proliferação das células epiteliais das vias biliares. É difícil determinar as zonas centrolobulares e localizar as veias centrolobulares. Não se observa megalocitose. Na cortex cerebral há vacuolização acentuada no limite entre as substâncias cinza e branca

(degeneração esponjosa, fig. 6 e 7), nesta última acompanhada de leucocitose acentuada; no bulbo há vacuolização moderada a acentuada, porém sem leucocitose. Há ainda em linfonodo leve edema da medular e rarefação moderada dos centros germinativos dos folículos linfóides, no miocárdio leve edema dissociando feixes de fibras cardíacas com pequenos infiltrados linfo-histiocitários, no rim dilatação da cápsula de Bowman que contém grande quantidade de substância eosinófila homogênea.

Experimentos com as inflorescências e vagens verdes e maduras

Bovino 4202, macho, mestiço holandês preto e branco, com 110 kg, recebeu as inflorescências e as vagens verdes e maduras de *C. anagyroides* durante um dia (9.5.79), ingerindo 6700 g (55,8 g/kg). A planta foi dada inteira, sem ser picada, sem acréscimos, posta na boca, pois o animal não a comia no cocho. Não mostrou sintomas de intoxicação imediatamente após a administração da planta, aumentando lenta e constantemente de peso, alcançando em 9.1.80, 188 kg. A partir de janeiro de 1980 mostrou apetite variável, comendo bem nuns dias e mal nos outros. Perdeu peso, baixando em 12.3.80 para 175 kg. Em virtude de seu estado de nutrição precário, foi sacrificado em 9.5.80. — *Achados de necropsia*: fígado mais claro na superfície; ao corte de cor alaranjado-clara e com desenho de rede de filigrana delicada e áreas do tamanho de cabeça de alfinete (diâmetro de 2 mm) de coloração castanha; após fixação em formol, percebia-se que a superfície de corte estava granulada, semeada de pequenas saliências do tamanho de cabeça de alfinete. — *Exames histopatológicos* (SAP 22727) revelam no fígado leve proliferação de fibroblastos nos espaços porta e ao redor dos numerosos nódulos de regeneração, leve proliferação das células epiteliais das vias biliares nos espaços porta, ativação das células de Kupffer, megalocitose leve em intensidade e frequência, presença de células hepáticas em pequena quantidade, principalmente ao redor dos espaços porta, com seu citoplasma mais eosinófilo e seus núcleos mais basófilos e levemente retraídos.

Bovino 4206, macho, mestiço zebu, com 140 kg, recebeu as inflorescências e as vagens verdes e maduras de *C. anagyroides* durante quatro dias. Comeu em 17.7.79, 5400 g (38,6 g/kg), em 18.7.79, 5100 g (36,4 g/kg), em 19.7.79, 3000 g (21,4 g/kg) e em 20.7.79, 6500 g (46,4 g/kg), no total de 20000 g (142,8 g/kg). A planta foi dada sempre picada no cocho. No 1º dia inicialmente a comeu regularmente sem acréscimos; foi então adicionado melaço e concentrado; o último quilo foi dado na boca do animal. Do 2º dia em diante o melaço e o concentrado foram logo acrescidos à planta picada. No 2º dia comeu tudo sozinho. No 3º dia comeu devagar; o último quilo foi dado na boca do animal. No 4º dia não comeu sozinho; quase tudo foi dado na boca do animal; o restante foi misturado com capim picado e o animal o comeu bem. Durante os dias de administração da planta o animal não mostrou sintomas de intoxicação. No início de 1980 o bezerro foi colocado com outros num piquete. Em 25.4.80 o bezerro chamou a atenção por estar separado dos outros. Em 28.4.80 foi notado que tinha dificuldade em se manter equilibrado. Foi levado para o box, andando com dificuldade, balançando muito, mas sem cair. Em 29 e 30.4, e 1.5.80 constantemente levantava-se e deitava-se. Contraía o abdômen a pequenos intervalos. Não defecava, nem comia, mas bebia água. Em 1.5.80 à tarde eliminou pequena quantidade de fezes pastosas. Em 2.5.80 amanheceu em decúbito lateral, continuando a se contrair; leve prolapso do reto. Olhos salientes. Eliminou pequena quantidade de fezes ressequidas. Em 3.5.80 continuou na mesma posição. Em 4.5.80 foi sacrificado às 9 h, em agonia. — *Achados de necropsia*: na cavidade abdominal, presença de pequena quantidade de líquido amarelo-claro. Edema leve no mesocólon. Edema regular do mesoduodeno na região próxima à vesícula biliar. Edema regular das pregas do coagulador. Fígado com sua superfície e ao corte de cor alaranjado-clara, ao corte se revelando mais duro que o normal. Superfície de corte do fígado revelou fina rede esbranquiçada tipo filigrana. Tanto na superfície externa como na de corte, fazendo saliência, presença de numerosos nódulos (aprox. 50), com diâmetro de 5 a 10 mm, de coloração castanho-avermelhada. Vesícula biliar estendida, sua parede espessada, aparentemente fibrosada, com presença de bile verde-amarelada. — *Exames histopatológicos* (SAP 22725) reve-

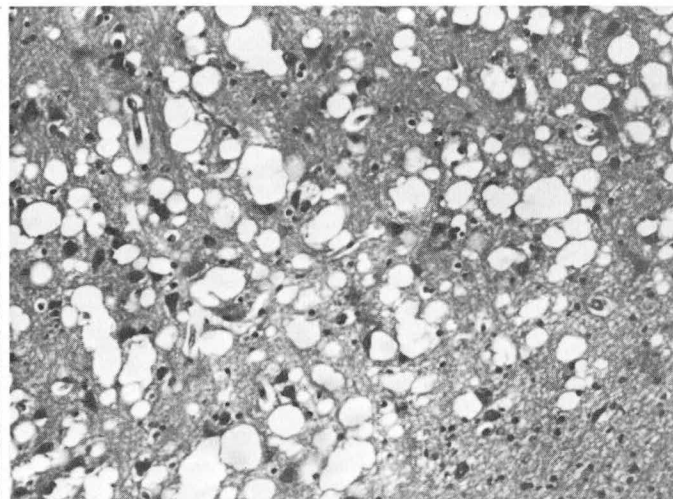
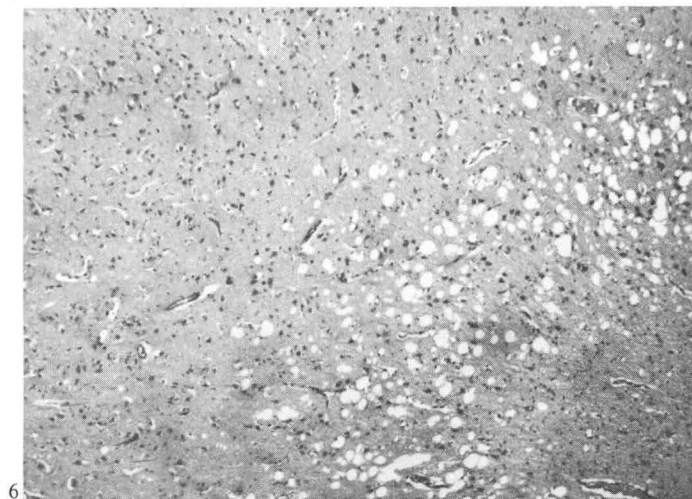
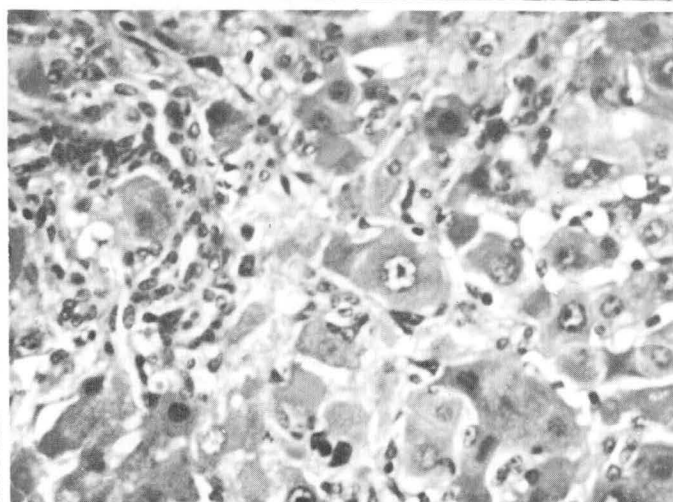
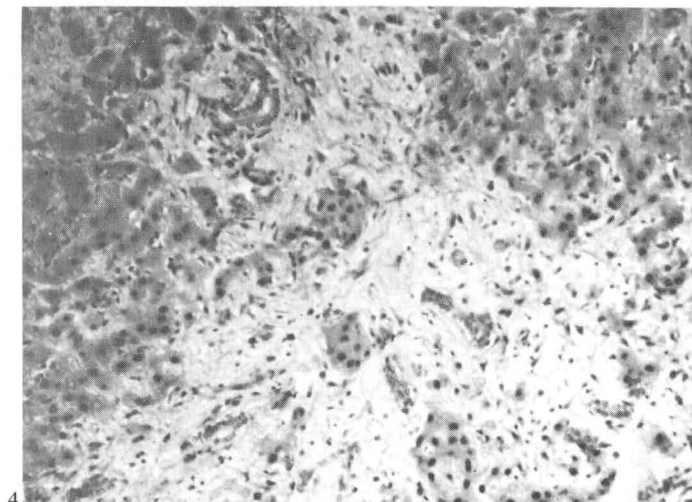
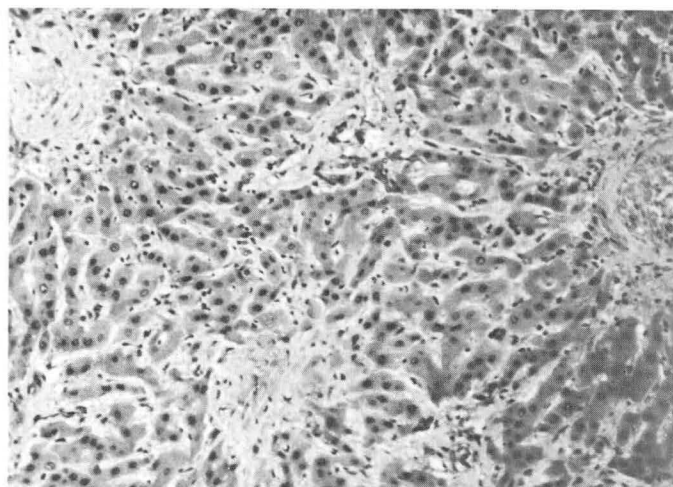
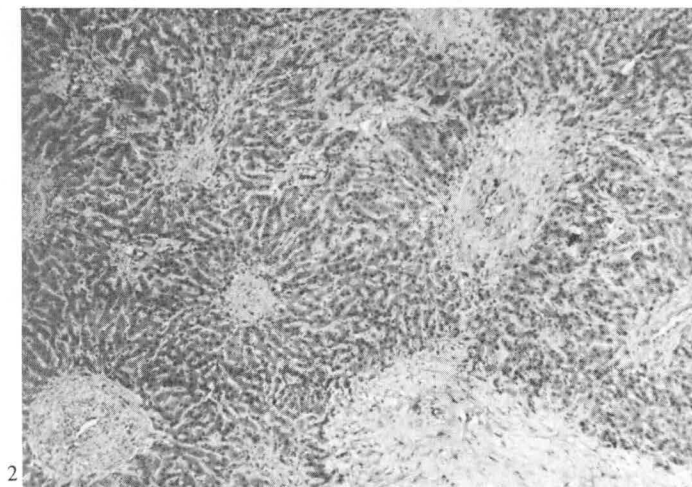


Fig. 2. Presença de abundante colágeno nos espaços porta e dentro do lóbulo hepático, na intoxicação crônica experimental por *Crotalaria anagyroides* (Bov. 4205). SAP 22634, H.-E., obj. 4.

Fig. 4. Grande quantidade de colágeno, separando grupos de células hepáticas, na intoxicação crônica experimental por *C. anagyroides* (Bov. 4209). SAP 22668, H.-E., obj. 10.

Fig. 6. Degeneração esponjosa no limite entre as substâncias cinzenta e branca na corteza cerebral, na intoxicação crônica experimental por *C. anagyroides* (Bov. 4205). SAP 22634, H.-E., obj. 4.

Fig. 3. Maior aumento da fig. 2, mostrando o colágeno sob forma de focos e, em menor quantidade, entre as trabéculas hepáticas. Obj. 10.

Fig. 5. Proliferação das células epiteliais das vias biliares e megalocitose, na intoxicação crônica experimental por *C. anagyroides* (Bov. 4206). SAP 22725, H.-E., obj. 25.

Fig. 7. Aumento maior da degeneração esponjosa no cérebro mostrado na fig. 6. Obj. 10.

lam no fígado, presença de quantidade moderada de colágeno sob forma de focos e feixes finos entre grupos de células hepáticas, subdividindo os lóbulos hepáticos, com presença de pequena quantidade de fibroblastos e acompanhado de leve a moderada proliferação das células epiteliais das vias biliares (Fig. 5). Arquitetura dos lóbulos pouco nítida, sendo difícil localizar as zonas e veias centrolobulares. Há megalocitose moderada em intensidade e frequência (Fig. 5), e nódulos grandes de regeneração com esteatose centrolobular (Sudan III pos.). Presença de células hepáticas em grande quantidade com seu citoplasma bastante eosinófilo e seus núcleos mais basófilos e levemente retraídos. Na corteza cerebral no limite entre substância cinza e branca há vacuolização leve, nos pedúnculos cerebelares e no bulbo de intensidade moderada (degeneração esponjosa).

Experimentos com as folhas e talos finos das pontas, inflorescências e vagens verdes e maduras

Bovino 4208, macho, mestiço zebu, com 222 kg, recebeu folhas, talos finos, inflorescências e vagens verdes e maduras de *C. anagyroides* durante 12 dias. Comeu em 20.9.79, 11500 g (51,8 g/kg), em 21 e 22.9.79 a média diária de 3300 g (14,9 g/kg), em 23.9.79, 7700 g (34,7 g/kg), em 24 e 25.9.79 a média de 4300 g (19,4 g/kg), em 26 e 27.9.79 a média diária de 4000 g (18,0 g/kg), em 28 e 29.9.79 a média diária de 4300 g (19,4 g/kg), em 30.9.79, 7900 g (35,6 g/kg) e em 1.10.79, 6500 g (29,3 g/kg), no total de 55400 g (294,8 g/kg). A planta foi dada sempre picada no cocho. No 1º dia comeu a planta bem, sem acréscimos. A partir do 2º dia não a quis comer assim; foi acrescido melaço, concentrado e capim picado, o animal comendo a mistura variavelmente e razoavelmente bem. No 9º e no 10º dias foi dada a mistura sem o melaço, o animal comendo melhor, e no 11º e 12º dias foi dada a planta picada, sem acréscimos, o animal comendo-a bem. Não mostrou quaisquer sintomas de intoxicação durante os dias da administração da planta nem depois, aumentando constantemente de peso e atingindo, em 17.1.80, 288 kg, quando foi colocado com outros bezerros em um piquete. Foi sacrificado em 18.12.80 em bom estado de nutrição. — *Achados de necropsia*: sem alterações. — *Exames histopatológicos* (SAP 22801) revelam, no fígado, trabéculas hepáticas levemente separadas entre si com presença de quantidade bem pequena de colágeno frouxo e com discreto edema dos espaços de Disse, ativação das células de Kupffer, megalocitose discreta em intensidade e frequência.

Bovino 4209, macho, mestiço zebu, com peso de 215 kg, recebeu as folhas, talos finos das pontas, inflorescências e vagens verdes e maduras de *C. anagyroides* durante 12 dias. Comeu em 20.9.79, 11500 g (53,5 g/kg), em 21.9.79 nada comeu, em 22.9.79, 300 g (1,4 g/kg), em 23.9.79, 4500 g (20,9 g/kg), em 24 e 25.9.79 a média diária de 2550 g (11,9 g/kg), em 26 e 27.9.79 a média diária de 1250 g (5,8 g/kg), em 28 e 29.9.79 a média diária de 2875 g (13,2 g/kg), em 30.9.79, 4400 g (20,5 g/kg) e em 1.10.79, 6500 g (30,2 g/kg), totalizando 40550 g (188,3 g/kg). A planta foi dada sempre picada no cocho. No 1º dia o animal inicialmente comeu bem a planta, depois só com acréscimo de melaço. No 2º dia não a comeu nem picado sem acréscimos, nem com melaço. No 3º dia comeu pouco da planta picada acrescida de melaço, concentrado e capim picado. No 4º dia comeu a planta bem, só picada, sem acréscimos. No 5º, 6º, 7º e 8º dias só se conseguiu fazê-lo comer quantidades pequenas da planta picada acrescida de melaço, concentrado e capim picado. No 9º e 10º dias foi dada a mistura sem o melaço, o animal comendo melhor. Nos 11º e 12º dias foi dada a planta picada, sem acréscimos, o animal comendo-a bem. Não mostrou quaisquer sintomas de intoxicação durante os dias da administração da planta. A partir de 28.10.79 teve anorexia muito variável que se estendeu durante o mês de novembro, de intensidade leve a acentuada, comendo muito pouco uns dias, regularmente em outros e raramente bem, emagrecendo bastante (em 25.10.79 pesava 219 kg, em 10.11.79, 213 kg). Em 2.12.79, às 7.00 h, estava aparentemente normal. Logo em seguida, quando foi solto no pátio, começou a demonstrar grande inquietação, rodando sem parar, com andar levemente cambaleante, e ameaçando avançar contra as pessoas; uma vez avançou contra a cerca de tábuas com ímpeto, machucando o focinho; estava com sialorréia. Fazia esforços para defecar sem o conseguir. Às 13 horas continuava com esses

sintomas. Às 15 horas foi encontrado morto. — *Achados de necropsia*: presença de pequena quantidade de líquido de cor cítreo no saco pericárdico (aprox. 200 ml). Fígado na superfície e ao corte com coloração alaranjado-clara, com lobulação nítida, e mais duro ao corte. — *Exames histopatológicos* (SAP 22668) revelam no fígado, presença de colágeno em grande quantidade em focos e feixes entre grupos de células hepáticas (Fig. 4), subdividindo os lóbulos hepáticos, e em menor quantidade entre as células hepáticas, com presença de quantidade leve a moderada de fibroblastos e acompanhado de leve proliferação das células epiteliais das vias biliares. É difícil determinar as zonas centrolobulares e localizar as veias centrolobulares. Observa-se megalocitose discreta em intensidade e frequência.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As partes aéreas de *Crotalaria anagyroides* revelaram-se tóxicas para bovinos nos experimentos realizados. Todos os seis bezerros que ingeriram a planta, ou as folhas, ou as inflorescências e as vagens, ou tudo junto, em quantidades que oscilaram de 6,7 a 55,4 kg, sofreram a ação tóxica da planta, em grau variável. Os experimentos não permitem deduzir se há variação de toxidez entre as diferentes partes da planta. Durante ou imediatamente após a ingestão da planta, os bezerros não mostraram sintomas de intoxicação, com exceção de leves sintomas em dois; um (Bov. 4200) mostrou, imediatamente após os dias da administração da planta, leve anorexia, abdômen aumentado de volume e andar arrastado durante 3 dias, e o outro (Bov. 4205) teve, durante os dias da administração e um dia após, ao todo durante 4 dias, fezes diarreicas. Sintomas mais graves apareceram somente bem mais tarde em cinco dos seis bezerros. Só um deles (Bov. 4208) nunca mostrou sintomas de intoxicação, porém a ação tóxica da planta evidenciou-se nesse animal pelas alterações histopatológicas. Os sintomas de intoxicação apareceram de 38 dias (Bov. 4209) a 9 meses e 8 dias (Bov. 4206) após o início da ingestão da planta, período em que os animais estavam aparentemente sadios e em bom estado de nutrição. A sintomatologia apresentada pelos animais nesta fase remota, em relação à ingestão da planta, foram anorexia e emagrecimento durante períodos de semanas a meses (Bov. 4200, 4202 e 4209), e/ou sintomas nervosos durante período mais curto (dias), de excitação (Bov. 4206 e 4209) ou de depressão (Bov. 4205). Dois animais tiveram também contrações abdominais durante alguns dias (Bov. 4205 e 4206).

Os achados de necropsia mais importantes foram alterações hepáticas (Quadro 3). O fígado era mais duro ao corte e tinha, tanto na superfície como ao corte, coloração alaranjado-clara; na superfície de corte se percebiam alterações que variaram desde o aspecto lobular nítido (Bov. 4205, 4209), granular (Bov. 4200, 4202), até à presença de nódulos (Bov. 4200, 4206). Em três animais viram-se derrames de líquido claro com aspecto cítreo e edemas, sendo que em um deles (Bov. 4205) havia grande acúmulo de líquido na cavidade abdominal e pequenas quantidades nas cavidades torácica e pericárdica, edema de todo o mesentério e edema muito acentuado das pregas do coagulador; em outro animal (Bov. 4206) foi vista leve ascite, com leve edema do mesentério e regular edema das pregas do coagulador, e no terceiro (Bov. 4209) havia só hidropericárdio.

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Crotalaria anagyroides*Quadro 2. *Resumo dos principais dados sobre a intoxicação experimental por Crotalaria mucronata (Tokarnia & Döbereiner 1982), para fins de comparação com a intoxicação experimental por Crotalaria anagyroides em bovinos*

Planta				Sintomas		
Bovino nº	Dose diária g/kg	Número de administrações	Dose total g/kg	Início após começo da ingestão da planta	Evolução e manifestações	Término e lesões
<i>Experimentos com as folhas. Administrações únicas</i>						
4355	10	1	10	s.s. (a)	—	—
3494	20	1	20	s.s.	—	—
4370	20	1	20	s.s.	—	—
4379	20	1	20	22 horas	25 horas (leves perturbações digestivas)	Recuperou-se
4364	25	1	25	24 horas	44 horas (tremores musculares, anorexia, ressecamento das fezes)	Morreu; hidrotorax e edema pulmonar
4365	25	1	25	19 horas	24 horas (leves perturbações digestivas)	Recuperou-se
4363	30	1	30	24 horas	72 horas (moderadas perturbações digestivas)	Recuperou-se
4367	30	1	30	22 horas	32 horas (leves perturbações digestivas)	Recuperou-se
3560	40	1	40	9 horas	24 horas (leves perturbações digestivas)	Recuperou-se
3563	40	1	40	6 horas	23 horas (leves perturbações digestivas)	Recuperou-se
3561	60	1	60	22 horas	32 horas (tremores musculares, anorexia, fezes ressequidas)	Morreu; esteatose hepática
3564	80	1	80	13 horas	4 horas (tremores musculares, anorexia, fezes ressequidas)	Morreu; degeneração hidrópico-vacuolar difusa do parênquima hepático
<i>Experimentos com as folhas. Administrações repetidas</i>						
3551	2,5	120	300	s.s.	—	—
3552	5	60	300	s.s.	—	—
3481	10	30	300	s.s.	—	—
<i>Experimentos com as folhas e principalmente vagens verdes. Administrações únicas</i>						
3555	60	1	60	s.s.	—	—
4350	60	1	60	s.s.	—	—

(a) s.s. Sem sintomas.

Quadro 3. *Achados de necropsia em relação ao fígado na intoxicação experimental por Crotalaria anagyroides em bovinos*

Bovino nº	Consistência mais dura ao corte	Superfície de corte		
		De coloração alaranjada-clara	Com lobulação nítida	Granular ou com nódulos
4200	—	—	—	+
4205	+	+	+	—
4202	—	+	—	+
4206	+	+	—	+
4208	—	—	—	—
4209	+	+	+	—

As alterações histopatológicas mais importantes consistiram em cirrose hepática (Quadro 4). O fígado mostrava presença de tecido colágeno em quantidade moderada a acentuada (Bov. 4205, 4206, 4209) ou em quantidade discreta (Bov. 4208), proliferação discreta a leve/moderada das células epiteliais das vias biliares (Bov. 4200, 4202, 4205, 4206, 4209), e leve a leve/moderada proliferação de fibroblastos (Bov. 4202, 4205, 4206, 4209), ativação das células de Kupffer (Bov. 4200, 4202, 4208), megalocitose discreta a moderada, tanto em intensidade como frequência (Bov. 4200, 4202, 4206, 4208 e 4209), nódulos de regeneração (Bov. 4200, 4202, 4206), e

Quadro 4. Alterações histopatológicas na intoxicação experimental por *Crotalaria anagyroides* em bovinos

Bovino nº	Fígado						Sistema nervoso central	
	Presença de colágeno	Proliferação de fibroblastos	Proliferação das células epiteliais das vias biliares	Ativação das células de Kupffer	Megalocitose		Presença de nódulos de regeneração	Degeneração esponjosa
					Intensidade	Frequência		
4200 (22801) ^a	— ^b	—	(+)	+	+	+	+++	—
4205 (22634)	++(+)	+	+	—	—	—	—	++(+) e +++
4202 (27727)	—	+	+	+	+	+	+++	—
4206 (22725)	++	+	+(+)	—	++	++	+++	+ e ++
4208 (22799)	(+)	—	—	+	(+)	+(+)	—	—
4209 (22668)	+++	+(+)	+	—	(+)	(+)	—	—

^a Os números em parênteses correspondem ao registro do material para exame histopatológico no Setor de Anatomia Patológica da Unidade de Pesquisa de Patologia Animal da Embrapa.

^b — Sem alterações, (+) com alterações discretas, + leves, ++ moderadas, +++ acentuadas.

presença de gotas hialinas em muitas (Bov. 4200) ou poucas (Bov. 4202) células hepáticas. Ainda foram observadas alterações no sistema nervoso central de dois bovinos, consistindo em vacuolização da substância branca (degeneração esponjosa) (Bov. 4205 e 4206), que deve estar relacionada com a cirrose hepática e conseqüente hiperamonemia (Hooper et al. 1974, Hooper 1975).

Comparando-se os resultados desses experimentos de *Crotalaria anagyroides* com os obtidos nos experimentos de *Crotalaria mucronata* (Tokarnia & Döbereiner 1982), o que mais desperta a atenção é que o único quadro clínico-patológico obtido no presente estudo foi o de evolução crônica, de cirrose hepática, enquanto que na intoxicação por *C. mucronata* somente se provocou um quadro de evolução aguda, em que os sintomas mais evidentes nos animais que morreram foram tremores musculares. Com ambas as plantas foram feitos experimentos em que os bezerros receberam durante prazo curto grandes quantidades da planta, ou então, durante períodos mais longos, quantidades diárias menores, mas no total bem maiores. Pela leitura dos Quadros 1 e 2 se vê que as administrações, doses e períodos durante os quais as duas plantas foram dadas, não são exatamente iguais. Com ambas as plantas a principal preocupação era administrar as maiores quantidades possíveis durante o maior prazo possível. Este intento não pôde ser alcançado integralmente, pois no caso de *C. mucronata* os animais morreram ou adoeceram após a primeira dose mais elevada, encerrando-se aí o experimento, e no caso de *C. anagyroides* não se conseguiu dar quantidades tão elevadas como se desejava, em virtude da má palatabilidade da planta. Mesmo assim, podem-se fazer comparações.

Aos animais que ingeriram *C. mucronata* em grande quantidade de uma vez — e que adoeceram após menos que um dia e morreram de doença de evolução aguda com sintomas de tre-

more musculares, anorexia e fezes ressequidas — isto é, aos Bovinos 3561 (60 g/kg) e 3564 (80 g/kg), correspondem, em relação a *C. anagyroides*, o Bovino 4202, que comeu 55,8 g/kg da planta de uma só vez, e, servindo para fins de comparação, os Bovinos 4200 e 4205, que no primeiro dia ingeriram 71,2 e 89,4 g/kg desta planta. O primeiro desses três bovinos (Bov. 4202) não mostrou sintomas de intoxicação durante os próximos dias ou semanas e os outros dois (Bov. 4200 e 4205) mostraram somente perturbações leves, passageiras, principalmente digestivas, durante os 3 ou 5 dias de administração da planta e imediatamente após.

Aos animais que ingeriram *C. mucronata* durante períodos mais longos sem adoecer e sacrificados após vários meses não revelaram lesões, isto é, aos Bovinos 3551, 3552 e 3481, que receberam diariamente 2,5, 5 e 10 g/kg durante 120, 60 e 30 dias respectivamente, ingerindo cada um o total de 300 g/kg, correspondem, em relação a *C. anagyroides*, o Bovino 4200, que comeu o total de 175,7 g/kg em 3 dias, o Bovino 4205, que comeu o total de 244,5 g/kg em 5 dias, o Bovino 4206, que comeu o total de 142,8 g/kg em 4 dias, o Bovino 4208, que comeu o total de 294,8 g/kg em 12 dias, e o Bovino 4209, que comeu 188,3 g da planta por kg também em 12 dias, bovinos esses que, com exceção de um (Bov. 4208), adoeceram. Desses animais, um se recuperou (Bov. 4200), um foi sacrificado em precário estado de nutrição (Bov. 4202), outro foi sacrificado em agonia (Bov. 4206) e os outros dois morreram (Bov. 4205 e 4209); todos eles adoeceram somente semanas ou meses após a ingestão da planta, com quadro clínico-patológico de cirrose hepática.

Na comparação dos casos de intoxicação experimental por *C. mucronata* e *C. anagyroides* através de doses diárias repetidas, deve-se, no entanto, apontar algumas diferenças nos experimentos. No caso de *C. mucronata* as doses diárias foram

menores, o período, durante o qual foram feitas as administrações, foi maior e o total administrado foi sempre maior do que nos experimentos com *C. anagyroides*. O ideal seria, ter para comparação dos experimentos com dosagens repetidas de *C. anagyroides*, bovinos que tivessem recebido 20-40 g/kg de *C. mucronata* por dia durante uns 10 dias, o que não foi possível devido estes animais, na maioria dos casos, terem adoecido já após a primeira destas doses diárias, não se podendo dar sequência à série. Além disto, foi difícil já após alguns dias administrar a planta fresca na dose diária de somente 10 g/kg, mesmo sem os animais adoecerem.

Interessante ainda é notar que enquanto nos experimentos com *C. anagyroides* não se observou diferença na ação entre as folhas, inflorescências e frutos, ou todas as partes aéreas da planta, nos experimentos com *C. mucronata* fresca recém-coletada só as folhas se revelaram tóxicas.

Não temos históricos nem fizemos observações que evidenciem ter sido *Crotalaria anagyroides* a causa de doença espontânea em bovinos. Acreditamos que dificilmente isto poderá acontecer em virtude da má palatabilidade que a planta demonstrou ter para os bovinos em nossos experimentos.

Agradecimentos. - Agradecemos à Dra. Graziela Maciel Barroso, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, à Prof. Maria do Carmo da Costa Monteiro, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Prof. Marcelo de Atafide Silva, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, Recife, e ao Prof. Joseph H. Kirkbride, do Departamento de Biologia Vegetal, Fundação Universidade Brasília, pela identificação do material botânico; ao Dr. Paulo Vargas Peixoto, médico-veterinário bolsista da Embrapa no Setor de Anatomia Patológica da Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, pela ajuda na revisão das preparações histopatológicas.

REFERÊNCIAS

- Barroso G.M. 1974. Comunicação pessoal (Jardim Botânico do Rio de Janeiro).
- Hooper P.T. Spongy degeneration in the central nervous system of domestic animals. Part III: Occurrence and pathogenesis - Hepatocerebral disease caused by hyperammonaemia. Acta neuropath. (Berl.) 31: 343-351.
- Hooper P.T., Best S.M. & Murray D.R. 1974. Hyperammonaemia and spongy degeneration of the brain in sheep affected with hepatic necrosis. Res. Vet. Sci. 16: 216-222.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1982. Intoxicação experimental por *Crotalaria mucronata* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. 2(2): 77-85.

PREVALÊNCIA DO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA NO REBANHO LEITEIRO DO PARANÁ¹

CARLOS E. KANTEK², ERNESTO R. KRUGER³ E VALDIR R. WELTE⁴

ABSTRACT.- Kanteck C.E., Kruger E.R. & Welte V.R. 1982. [Prevalence of enzootic bovine leukosis virus in dairy cattle in Parana.] Prevalência do vírus da leucose enzoótica bovina no rebanho leiteiro do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 3(4): 125-129. Depto Med. Vet., Univ. Fed. Paraná, Cx. Postal 672, Curitiba, PR 80000, Brazil.

A representative sample of blood from dairy cattle in the State of Parana was tested for the presence of antibodies against the virus of enzootic bovine leukosis (EBL) and it was found that the general prevalence of the virus was 20.7%, in 40.8% of the surveyed farms. The higher prevalences of the virus were found in the areas of the State where the economic significance of dairy production is greater and this prevalence was also higher in the older animals and in those of the Holstein breeds.

INDEX TERMS: Enzootic bovine leukosis, virus, leukemia.

SINOPSE.- Uma amostragem representativa de sangue do rebanho bovino produtor de leite do Estado do Paraná foi submetida à prova específica para verificação de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina (LEB), tendo sido encontrado um índice geral de prevalência de 20,7% em 40,8% das propriedades pesquisadas. As maiores prevalências do vírus foram encontradas nas áreas do Estado onde a importância econômica da bovinocultura de leite é maior e esta prevalência foi maior nos animais mais velhos e naqueles das raças Holandesas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leucose enzoótica bovina, vírus, leucemia.

INTRODUÇÃO

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma doença que na sua forma clínica se manifesta pelo aparecimento de um tumor maligno do tecido linfático, denominado linfossarcoma (Olson 1974, Ferrer 1980). A enfermidade é causada por um vírus RNA (Miller et al. 1969) e a sua distribuição é quase universal (Ferrer 1980). No Brasil o linfossarcoma bovino foi descrito

pela primeira vez em 1959 (Merck, Santos et al.) e desde então essa neoplasia tem sido identificada várias vezes (Vaske et al. 1964, Freire e Freitas 1966, Dacorso Filho et al. 1969, Cavalcanti et al. 1969). Os levantamentos sorológicos, no entanto, são mais recentes e foram feitos até agora em São Paulo (Alencar Filho et al. 1979) e no Rio de Janeiro (Romero e Rowe 1981). No Paraná existem relatos da forma tumoral da doença (Diniz et al. 1980) mas até o momento não era conhecido o índice de prevalência do vírus causador da LEB no rebanho bovino produtor de leite. O presente trabalho visou estabelecer essa prevalência.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O levantamento foi realizado nas regiões do Estado onde a bovinocultura de leite apresenta notável importância econômica. Essas regiões foram denominadas de indústrias de exploração leiteira (IEL) e incluíram: 1) Cooperativa Agropecuária de Londrina Ltda (CATIVA): municípios de Grandes Rios, Faxinal, Londrina, Sabaúdia, Sertãozinho e Cambé; 2) Cooperativa Mista Agropecuária Witmarsun Ltda (WITMARSUN): município de Palmeira; 3) Laticínios Rainha Ltda (RAINHA): municípios de Marechal Cândido Rondon e Guaíra; 4) Cooperativa Agropecuária Cascavel Ltda (COOPAVEL): municípios de Toledo, Cascavel e Céu Azul; 5) Cooperativa Agrícola Consolata Ltda (COOPACOL): municípios de Cafelândia do Oeste, Formosa do Oeste, Nova Aurora e Assis Chateaubriand; 6) Laticínios Nova Esperança Ltda (N. ESPERANÇA): municípios de Atalaia, Cruzeiro do Sul, Nova Esperança, Uniflor e Santa Fé; 7) Cia. Leco de Produtos Alimentícios (LECO): municípios de Alto Paraná, Guairacá e Paranavai; 8) Cooperativa Central de Laticínios do Paraná (CCLP): municípios de Ponta Grossa, Castro, Arapoti, Teixeira Soares, Irati e Rebouças e 9) Cooperativa de Laticínios Curitiba Ltda (CLAC): municípios de Mandirituba, São José dos Pinhais, Antonina, Curitiba, Balsa Nova, Lapa, Adrianópolis, Céu Azul, Piraquara, Araucária, Campo Largo e Colombo (Fig. 1).

¹ Aceito para publicação em 8 de junho de 1983.

O resumo do presente trabalho foi apresentado no XVIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária em Camboriú, Santa Catarina, 18-23.10.1982.

² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Cx. Postal 672, Curitiba, Paraná, 80000. Bolsista do CNPq.

³ Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, Rua Jaime Balão 575, Curitiba, Paraná 80000.

⁴ Secretaria da Agricultura do Paraná, Cx. Postal 464, Curitiba, Paraná, 80000.

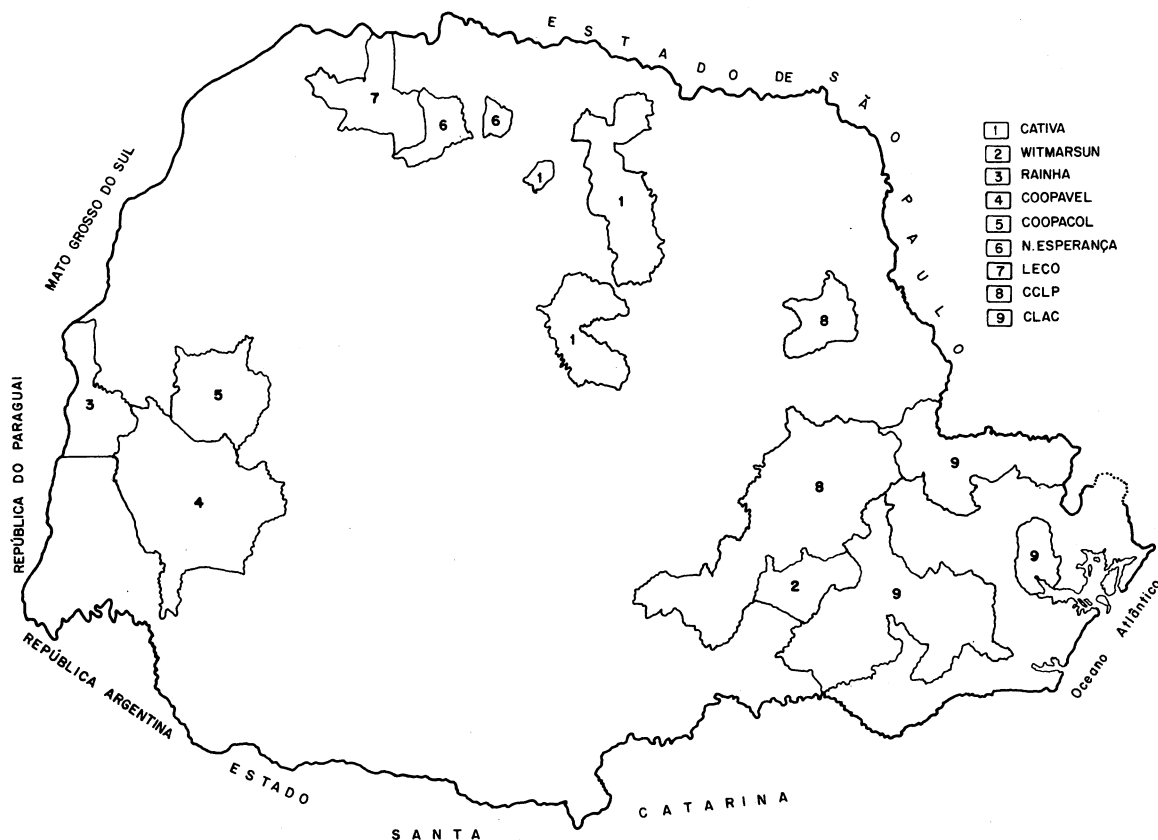


Fig. 1. Áreas abrangidas pelas diversas IELs utilizadas na pesquisa de anticorpos contra o vírus da LEB no Estado do Paraná.

Estabelecimento da amostra

Como não se tinha conhecimento do número exato de cabeças de gado leiteiro nessas áreas, houve necessidade de se obter um rebanho total estimado, utilizando-se para isso indicadores de produção e de estrutura de rebanhos fornecidos pela Comissão Estadual de Planejamento Agrícola (CEPA) do Departamento de Economia Rural (DERAL) da Secretaria de Agricultura do Paraná (SEAG-PR). A quantidade de litros de leite fornecidos às IELs foi dividida pela produção média mensal de cada vaca, chegando-se então ao número estimado de vacas em produção. Ainda segundo os dados do DERAL, sabe-se que no Paraná esse número é de aproximadamente 1/3 do rebanho total (DERAL-SEAG-PR, comunicação pessoal 1982). Assim, multiplicando-se o número de vacas em produção por 3, chegou-se ao número estimado do rebanho total de bovinos leiteiros por IEL (Quadro 1).

Para cálculo do tamanho da amostra, admitiu-se um erro de 10% e um intervalo de confiança de 99% para uma prevalência estimada em 50%, uma vez que era desconhecida a real prevalência da leucose bovina na sua forma infecciosa no rebanho leiteiro do Estado. Pôde ser então montada a seguinte equação:

$$n = \frac{P (100 - p) Z^2}{\left(\frac{e \cdot p}{100}\right)^2}$$

onde $e = 10\%$, $IC = 99\%$, $Z = 2,58$, $p = 50\%$ e $n = 666$ (Centro Panamericano de Zoonosis 1973).

Ao número obtido de 666 foram acrescentadas depois mais 25% de coletas com a finalidade de suprir possíveis falhas de coleta ou remessa.

O número de testes realizados foi depois aumentado para um total de 695 (Quadro 1).

Uma vez estabelecida a amostragem total, obteve-se o número de amostras por IEL (n_i) o qual foi proporcional ao tamanho da população no respectivo estrato. Aleatoriamente estabeleceu-se que o número máximo de amostras por propriedade seria de 5 ($K = 5$). Com a finalidade de diminuir possíveis vícios de amostragem foi utilizada a técnica de seleção sistemática ao acaso (Astudillo 1979). Para obtenção do número de propriedades (n_{pi}) por IEL, o número de animais a amostrar em cada IEL (n_i) foi dividido pelo número de coletas por propriedades (K). Para o cálculo do intervalo de seleção das propriedades por estrato (I_i), o número total de propriedades por IEL (N_{pi}) foi dividido pelo número de propriedades a serem visitadas na respectiva IEL (n_{pi}). O processo de seleção das propriedades já numeradas por IEL foi iniciado então através de seleção de um número ao acaso para cada IEL (Biblioteca Geral da Calculadora Texas TI 59 1977), tendo sido assim obtida a relação nominal dos produtores componentes da amostra.

Coleta e remessa do material

Os animais participantes da amostragem foram puncionados na veia jugular externa com agulhas descartáveis, colhendo-se de cada animal entre 10 e 15 ml de sangue em frascos contendo uma solução comercial de etilenodiaminotetraacetato de sódio⁵ como anticoagulante. Posteriormente o sangue foi remetido via rodoviária e sob refrigeração ao laboratório em Curitiba, onde o plasma foi separado e acondicionado em congelador até o momento do uso.

⁵ Hemstab MR. Laboratório Labtest S.A., Belo Horizonte, MG.

PREVALÊNCIA DO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

Quadro 1. *Demonstrativo do número percentual de produtores, população bovina estimada e percentual, número de amostras a testar e número de animais a amostrar, por indústria leiteira^(a) no Estado do Paraná*

Indústria leiteira	Número de produtores	Proporção de produtores (%)	Popul. bov. estimada	Prop. popul. bov. est. (%)	Nº amostras a testar	Nº animais a amostrar
CATIVA	662	9,56	59.780	13,58	90	113
WITMARSUN	303	4,38	52.842	12,00	80	100
RAINHA	2.714	39,25	41.269	9,37	62	78
COOPAVEL	333	4,82	7.328	1,66	11	14
COOPACOL	161	2,33	3.891	0,88	6	7
N. ESPERANÇA	148	2,14	16.888	3,84	26	32
LECO	318	4,60	13.365	3,04	20	25
CCLP	463	6,70	134.142	30,46	203	254
CLAC	1.813	26,22	110.823	25,17	168	210
Total	6.915	100,00	440.328	100,00	666	833

(a) Mais expressivas em termos de produção.

Testes imunológicos

O teste utilizado foi o de imunodifusão em ágar gel (Miller e Van der Maaten 1977) com antígeno cedido por seu fabricante, o laboratório americano Pittman-Moore⁶, através de seu representante no Brasil, a Johnson & Johnson S.A.

RESULTADOS

Das 695 amostras examinadas, 144 foram positivas (20,7%). Foram encontrados animais positivos em 75 das 184 propriedades visitadas (40,8%). Os resultados individuais por IEL estão no Quadro 2. Os animais constantes da amostragem total foram depois arbitrariamente divididos em 4 grupos etários e ainda foram agrupados por raça em 2 grupos: um formado pelos animais das raças holandesas (preto-branco e vermelho-

branco em conjunto) e outro formado pelos animais de outras raças e os mestiços em conjunto. Os resultados dos exames nas diferentes faixas etárias estão no Quadro 3 e os resultados por raças no Quadro 4. Houve associação significativa entre o vírus da LEB e o grupo das raças holandesas, mas essa mesma associação não foi verificada entre o vírus e as diferentes faixas etárias. Considerando ainda a prevalência obtida de 20,7% e calculando o desvio padrão ($\delta = 1,5374$), estabeleceu-se a real prevalência do vírus da LEB no rebanho leiteiro do Paraná com probabilidade não menor que 99%, ficando ela entre 16,75% e 24,7% ($24,7 \geq P \geq 16,75 = 0,99$). Não houve preocupação em agrupar os resultados por sexo uma vez que 99,86% da amostra (679 animais) eram do sexo feminino e apenas 0,14% (16 animais) da amostra eram machos.

⁶ *Leukoassay B.* Pittman-Moore Inc., Washington Crossing, New Jersey, USA.

Quadro 2. *Demonstrativo de amostras e propriedades, positivas e negativas para leucose bovina, no Estado do Paraná*

Indústria leiteira	Amostras examinadas				Propriedades visitadas			
	Positivas	% de positivas ^(a)	Negativas	Total	Positivas	% de positivas	Negativas	Total
CATIVA	12	13,33	78	90	11	32,35	23	34
WITMARSUN	20	25,00	60	80	9	56,25	7	16
RAINHA	2	3,17	61	63	2	9,09	20	22
COOPAVEL	0	—	13	13	0	—	3	3
COOPACOL	0	—	18	18	0	—	7	7
N. ESPERANÇA	2	6,90	27	29	1	11,11	8	9
LECO	2	8,00	23	25	2	22,22	7	9
CCLP	80	40,61	117	197	34	73,91	12	46
CLAC	26	14,44	154	180	16	42,11	22	38
Total	144	20,72	551	695	75	40,76	109	184

(a) Positivos em relação ao total examinado na respectiva IEL.

Quadro 3. *Demonstrativo de amostras examinadas para leucose bovina e percentuais de positivos por faixa etária no rebanho bovino leiteiro do Estado do Paraná*

Indústria leiteira	Amostras examinadas								Total
	0 - 24 meses		25 - 60 meses		61 - 96 meses		Acima de 96 meses		
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	
CATIVA	—	—	5	38	4	32	3	8	90
WITMARSUN	—	—	14	38	5	18	1	4	80
RAINHA	0	6	1	25	1	24	0	6	63
COOPAVEL	0	1	0	7	0	3	0	2	13
COOPACOL	0	1	0	11	0	5	0	1	18
N. ESPERANÇA	—	—	0	14	2	13	—	—	29
LECO	—	—	2	13	0	8	0	2	25
CCLP	6	27	35	49	26	32	13	9	197
CLAC	1	16	17	72	6	53	2	13	180
Total	7	51	74	267	44	188	19	45	695
% de positivos dentro das faixas	12,07		21,07		18,97		29,69		
% de positivos das faixas em relação ao total	1,01		10,65		6,33		2,73		20,72

Quadro 4. *Demonstrativo de amostras examinadas para leucose bovina e percentuais de positivos por raças e por IELs no rebanho bovino leiteiro do Estado do Paraná*

Indústria leiteira	Raças holandesas (PB e VB)			Outras raças			Total
	Pos.	% de pos.	Neg.	Pos.	% de pos.	Neg.	
CATIVA	1	7,69	12	11	14,47	65	89
WITMARSUN	17	24,29	53	3	30,00	7	80
RAINHA	0	—	3	2	3,33	58	63
COOPAVEL	0	—	5	0	—	8	13
COOPACOL	0	—	3	0	—	15	18
N. ESPERANÇA	2	66,67	1	0	—	26	29
LECO	—	—	—	2	8,00	23	25
CCLP	66	42,58	89	14	33,33	28	197
CLAC	24	17,14	116	2	5,00	38	180
Total	110	28,06	282	34	11,26	268	694 ^(a)
% da raça em relação ao total	15,83			4,89			

(a) Houve 1 animal da raça Nelore que apresentou resultado negativo.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que o vírus da LEB se encontrou presente em 7 das 9 regiões pesquisadas e que a sua prevalência foi maior justamente nas regiões onde a exploração econômica da bovinocultura de leite é mais intensa no Estado, nominalmente as regiões atendidas pela CCLP, WITMARSUN, CLAC e CATIVA. Esses resultados podem ser interpretados como consequência da maior exposição dos animais nelas existentes aos fatores que podem determinar maior contágio pelo vírus cuja principal forma de disseminação é horizontal (Piper et al. 1979, Avram et al. 1980, Ferrer 1980). Tais fatores são

a maior rotatividade dos animais nas propriedades e a repetida introdução nelas de animais oriundos de outras localidades e que podem servir como amplificadores da infecção. Recentemente foi encontrado o índice de 18,3% de positividade para o vírus da LEB em um lote de vacas leiteiras importadas do Uruguai e destinadas aos cooperados da CLAC (Kantek-Navarro et al. 1982). Ainda como uma das causas dos índices mais elevados encontrados nessas regiões pode ser citada a prática de premunicação contra a babesiose comumente realizada nessas áreas. Evidências sugerindo conexão entre a premunicação contra a babesiose e o aparecimento de casos de leucose em bovinos foram demonstradas primeiramente na Suécia por

Olson (1961) e posteriormente discutidas por Hugoson (1969). A transfusão de sangue que se realiza nessa operação seria a maneira de transmissão do vírus e isso foi recentemente confirmado no Brasil por Romero e colaboradores (1982).

Os índices dentro das diferentes faixas etárias mostraram que a prevalência aumentou com a idade dos animais estudados, permanecendo menor nos animais mais jovens. A explicação desse fato deve levar em conta dois fatores: a presença de anticorpos de origem materna recebidos através do colostro pelos filhos de mães positivas, o que lhes concede uma proteção nas fases iniciais de suas vidas (Van der Maaten et al. 1981b) e a baixa transmissibilidade do vírus pela via uterina (Van der Maaten et al. 1981a). Quanto aos filhos de mães negativas, é natural que a exposição do animal ao vírus aumente com a idade. Deve ser levado em conta, no entanto, que essa relação entre o vírus e a idade dos animais positivos não foi significativa.

A relação entre o vírus e o grupo das raças holandesas apresentou significância estatística. Esse fato deve ser interpretado como consequência da maior participação desse grupo na exploração leiteira.

Nam apreciação geral, os resultados do presente trabalho indicaram estar o vírus da LEB presente no Estado do Paraná, com exceção da sua região Oeste. Esses resultados indicaram ainda que à época da realização do trabalho a probabilidade de prevalência do vírus no rebanho leiteiro do Estado permaneceu entre 16,75% e 24,7%, com a prevalência final de 20,7%. Se se considerar também que a percentagem de animais positivos sorologicamente que apresentam linfossarcoma em alguma fase de suas vidas é de aproximadamente 5% (Olson, comunicação pessoal 1979), o índice de mortalidade da doença no Paraná poderia ser colocado entre 1 e 2% de seu rebanho total.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao Dr. Richard S. Pohl, da Johnson & Johnson S.A., Divisão Veterinária pela obtenção e doação do antígeno; ao Dr. Nestor Werner e à equipe de médicos veterinários da Coordenadoria de Defesa Sanitária Animal da SEAG-PR, pelo apoio fornecido e pela coleta e remessa de material; ao Dr. Joaquim Francisco dos Santos F9, do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, pelo apoio material e incentivo, e à Da. Maria de Lurdes Pereira, pela sua ajuda no trabalho de laboratório.

REFERÊNCIAS

- Alencar Filho R.A., Mazanti M.T., Saad A.D. & Pohl R. 1979. Levantamento preliminar da infecção pelo vírus da leucemia linfática crônica (LCC) dos bovinos no Estado de São Paulo. *Biológico*, S. Paulo, 45:47-54.
- Astudillo V.M. 1979. Encuestas por muestreo para estudios epidemiológicos en poblaciones animales. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro. 60p.
- Avran N., Paunescu G., Begnescu R., Lungeanu A. & Mironescu D. 1980. Surce de infective cu virusul leucozei bovine (VLB) da la animalu infectat (Cu privire la prezenta VLB in unele produse secretu si excretu de animale leucemice. *Rev. Cresterea Anim.* 30(6): 34-38.
- Biblioteca Geral Texas TI Programável 59 1977. Um completo manual de instruções para TI Programável 58/59. Texas Inst. Elet. do Brasil, Campinas, SP. 89p.
- Cavalcanti M.I., Barreto S.C.P. & Costa Filho G.A. 1969. Sobre a ocorrência da leucose bovina no Estado de Pernambuco. *Pesq. Agropec. Bras.* 4:225-227.
- Centro Panamericano de Zoonosis 1973. Procedimiento para estudios de prevalencia de enfermedades cronicas en el ganado. Nota Tecnica n° 18, Ramos Mejia, Buenos Aires. 35p.
- Dacorso Filho P., Langenegger J., Faria J.F. & Aguiar A.A. 1969. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Veterinária, Belo Horizonte, p. 304.
- Diniz J.M.F., Baroni J.M., Fernandes B.F. & Martins D.M. 1980. Leucose bovina no Estado do Paraná. *Revta Setor Ciên. Agrárias, Curitiba*, 2(1):33-38.
- Ferrer J.F. 1980. Bovine lymphosarcoma. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* Vol. 24. Academic Press, New York. 68p.
- Freire M.H.R. & Freitas V.M. 1966. Constatacion de la leucose bovine dans l'Etat de Rio de Janeiro, Brésil. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 66: 775-782.
- Hugoson G. 1969. Studies on lymphocytosis in regions with high and low incidences of bovine leukosis and babesiosis. *Comp. Leuk. Res.* 36:537-543.
- Kantek-Navarro C.E., Kruger E.R. & Welte V.R. 1982. Infecção com o vírus da leucose enzoótica bovina em um lote de vacas produtoras de leite importadas do Uruguai. *Pesq. Vet. Bras.* 2(3): 125-126.
- Merkert H., Giudice C.O. & Müller J. 1959. Leucose bovina. *Revta Esc. Agron. Vet., Porto Alegre*, 2(3): 7-27.
- Miller J.M., Miller L.D., Olson C. & Gillette K.G. 1969. Virus-like particles in phytohemagglutinin stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl Cancer Inst.* 43:1297-1305.
- Miller J.M. & Van der Maaten M.J. 1977. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Europ. J. Cancer* 13: 1369-1375.
- Olson H. 1961. Studien über das Auftreten und die Verbreitung der Rinderleukose in Schweden. *Acta Vet. Scand.* 2, Suppl. 2: 13-46.
- Olson C. 1974. Bovine lymphosarcoma (leukemia). A synopsis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 165:630-632.
- Piper C.E., Ferrer J.F., Abt D.A. & Marshak R.R. 1979. Postnatal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. *J. Natl Cancer Inst.* 62:165-168.
- Romero C.H. & Rowe C.A. 1981. Enzoootic bovine leukosis virus in Brazil. *Trop. Anim. Hlth Prod.* 13: 107-111.
- Romero C.H., Zanocchi H.G., Aguiar A.A., Abracon D., Silva A.G. & Rowe C.A. 1982. Experimental transmission of enzoootic bovine leukosis virus with blood and milk in the tropics. *Pesq. Vet. Bras.* 2(1):9-15.
- Santos J.A., Pinheiro P.V., Silva J.J. 1959. Linfossarcoma com lesões na língua e nas câmaras cardíacas em bovino. *Anais Esc. Flum. Med. Vet.* 2: 1-8.
- Van der Maaten M.J., Miller J.M. & Schmerr M.J.F. 1981a. In utero transmission of bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 42(6): 1052-1054.
- Van der Maaten M.J., Miller J.M. & Schmerr M.J.F. 1981b. Effect of colostral antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* 42(9): 1498-1500.
- Vaske T.R., Grunert E., Teixeira J.S.A., Siqueira C.A. & Piança D. 1964. A ocorrência da leucose bovina em um rebanho do Rio Grande do Sul. *Anais III Conf. Soc. Vet. R.G. Sul, Porto Alegre*, p. 141-151.

PATOGENICIDADE DE UMA CEPA DO VÍRUS HERPES DA DOENÇA DE MAREK

LUIZ FELIPE DE CASTRO GRAEFF VIANNA² E CARLOS H. ROMERO³

ABSTRACT.- Vianna L.F.C.G. & Romero C.H. 1982. [Pathogenicity of a strain of Marek's disease herpes virus.] Patogenicidade de uma cepa do vírus herpes da doença de Marek. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 3(4):131-139. Embrapa-Patologia Animal, Km 47, Seropédica, RJ 23460, Brazil.

The objective of the present work was to study the pathogenicity of a Brazilian strain of Marek's disease herpes virus (MDV). Chicks experimentally infected at one day of age developed antibody which was detected by the agar gel precipitation test four weeks later. Contact-exposed chickens developed antibody after eight weeks. Antibody persisted through the 12th week, when the last assay was performed. Uninoculated control chickens reared in isolation remained free of antibody during the same period. Viral antigens were detected in impression smears of spleen, thymus and bursa of Fabricius of inoculated chickens and in those of spleen and bursa of Fabricius of contact-exposed chickens by using a direct immunofluorescent technique. No fluorescence was observed in impression smears of brain, liver, gonads or kidney of all chickens tested. Impression smears of all tissues from uninoculated control chickens were negative. Precipitating antibody against the herpes virus of turkeys was demonstrated in the blood, and tissue extracts of kidney, feather tips, spleen, thymus, bursa of Fabricius and gonads of inoculated and contact-exposed chickens. No antibody was found in similar tissue extracts from uninoculated control chickens. Lymphoid infiltration corresponding to types A, B and C and their combination were observed in the vagus nerves and in the nerves of the brachial and sciatic plexus of chickens experimentally inoculated with MDV. Lymphoid infiltrations in the skin, kidney and gonads, as well as lymphoid depopulation with cystic degeneration of the thymus and bursa of Fabricius, were observed in the inoculated chickens. Similar lesions were observed in the kidney, skin, and nerves of contact-exposed chickens. No microscopic lesions were present in the uninoculated control chickens. It is concluded that the strain of MDV studied induces clinical symptoms, macroscopic and microscopic lesions characteristic of the neural form of Marek's disease, stimulates the development of antibody in the serum, spreads horizontally, and gives rise to viral antigens and antibody detectable in tissue extracts.

INDEX TERMS: Virus, Marek's disease, pathogenicity.

SINOPSE.- O objetivo do presente trabalho foi estudar a patogenicidade de uma cepa brasileira do vírus herpes da doença de Marek (VDM). Aves experimentalmente infectadas com um dia de idade, desenvolveram anticorpos os quais foram detectados pelo teste de precipitação em gel de ágar, após quatro semanas. Aves expostas por contato desenvolveram anticorpos após oito semanas. Tais anticorpos persistiram até a 12ª semana, quando o experimento foi encerrado. Aves testemunhas (não inoculadas) mantidas em isolamento, permaneceram livres de anticorpos durante o mesmo período. Antígenos virais foram detecta-

dos em impressões de baço, timo e bursa de Fabricius de aves inoculadas e em impressões de baço e bursa de Fabricius de aves expostas por contato, através da prova de imunofluorescência direta. Fluorescência não foi observada em impressões de cérebro, fígado, gônadas e rins de todas as aves testadas. Todas as impressões de tecidos de aves testemunhas foram negativas. Anticorpos precipitantes contra o vírus herpes de perus (HVT) foram demonstrados no sangue e nos extratos de tecidos renal, pontas de penas, baço, timo, bursa de Fabricius e gônadas de aves inoculadas ou expostas por contato. Anticorpos não foram encontrados nos extratos dos mesmos tecidos, de aves testemunhas. Infiltrações linfocitárias correspondentes aos tipos A, B e C e suas combinações, foram observadas nos nervos vagos e nos plexos braquial e ciático de aves inoculadas experimentalmente com o VDM. Infiltrações linfocitárias na pele, rins e gônadas, assim como, despovoamento linfóide com degeneração cística do timo e da bursa de

¹ Aceito para publicação em 15 de junho de 1983.

² Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23460.

³ Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, EMBRAPA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23460.

Fabricius, foram encontradas nas aves inoculadas. Lesões semelhantes foram também observadas nos rins, pele e nervos das aves expostas por contato. Lesões microscópicas não foram visualizadas nas aves testemunhas. Conclui-se que a cepa do VDM estudada, induz sintomas clínicos, lesões macro e microscópicas características da forma neural da doença de Marek, estimula o desenvolvimento de anticorpos no soro, dissemina-se horizontalmente e dá origem a antígenos virais e anticorpos detectáveis nos extratos de tecidos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Vírus, doença de Marek, patogenicidade.

INTRODUÇÃO

A doença de Marek (DM) é uma neoplasia de natureza linfoproliferativa, descrita pela primeira vez pelo cientista húngaro Marek (1907), causada por um vírus herpes associado a célula (Churchill & Bigs 1967, Nazerian et al. 1968, Solomon et al. 1968). O hospedeiro natural é *Gallus domesticus*, mas o vírus também tem sido isolado de codornas, faisões e perus (Calnek & Witter 1978). O vírus da doença de Marek (VDM) replica-se no epitélio folicular das penas, onde são formadas partículas virais infecciosas com envelope. Este epitélio folicular parece ser o único local da ave onde o vírus é replicado constantemente até atingir a maturidade (Calnek et al. 1970). A descação constante das células epiteliais contendo o VDM infeccioso é responsável pela contaminação dos galpões e pela propagação da doença (Calnek et al. 1970).

As cepas do VDM variam na sua antigenicidade (von Bülow & Biggs 1975), virulência e tropismo tissular (Purchase & Biggs 1967) e na eficiência da imunidade homóloga ou heteróloga por elas produzidas (Witter et al. 1980, Witter 1982). As interações destas propriedades do VDM com o hospedeiro, são responsáveis pelas variações em suas formas clínicas neural, visceral, cutânea e ocular observadas em condições de campo. Porém, cepas padronizadas do VDM isoladas nos E.U.A., tais como a cepa GA (Eidson & Schmittle 1968) e a cepa JM (Sevoian et al. 1962) produzem quase exclusivamente lesões viscerais e neurais, respectivamente.

A DM constitui a única neoplasia para a qual existe uma vacina, a qual é utilizada extensivamente em todo mundo. Esta vacina é elaborada a partir da cepa FC-126 do vírus herpes de perus (HVT), isolado durante estudos sobre a prevalência do VDM nesta espécie (Witter et al. 1970).

Apesar do HVT ser utilizado no Brasil na prevenção da DM, através da vacinação maciça de pintos de um dia de idade, não existem relatórios sobre o isolamento e caracterização de cepas do VDM que ocorrem naturalmente em nossos plantéis avícolas. A disponibilidade de cepas autóctones, permitiria avaliar a capacidade imunogênica das vacinas usadas em nosso meio, bem como, estudar a doença em suas diferentes formas e iniciar pesquisas referentes aos mecanismos de imunidade que operam na proteção das aves vacinadas.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar uma cepa do VDM, isolada de uma ave não vacinada, com paralisia das pernas, com anticorpos específicos no soro e com lesões macro e microscópicas características da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Aves

Todas as aves foram Leghorn brancas da linhagem 7 sub-linha 2 (Stone 1975) originalmente obtidas do Regional Poultry Research Laboratory, East Lansing, MI., E.U.A., as quais são altamente susceptíveis a forma neural e visceral da doença de Marek (Witter & Burmester 1979). As matrizes da progênie utilizada no presente trabalho, tinham sido criadas sob condições de semi-isolamento e eram livres de anticorpos precipitantes no soro tanto contra o VDM como o HVT.

Vírus da doença de Marek

O VDM utilizado foi a segunda passagem de sangue heparinizado, infectado, mantido em 10% de dimetilsulfóxido em nitrogênio líquido. O vírus tinha sido isolado do sangue de um galo de briga, não vacinado, com sintomas clínicos e lesões macro e microscópicas características da forma neural da DM, por passagem sucessiva em pintos da linhagem 7₂ de um dia de idade. O sangue foi descongelado rapidamente em água a 37°C, diluído 1:5 em uma mistura dos meios de cultura F10 e 199 suplementados com 4% de soro de bezerro e utilizado como inoculam na infecção experimental das aves.

Antiseros de referência

Aves da linhagem 7₂ de um dia de idade, foram inoculadas intra-abdominalmente com 0,1 ml da segunda passagem do sangue contendo o VDM. Todas as aves que não desenvolveram a doença clílica foram novamente inoculadas aos 2, 3 e 7 meses de idade com 0,5, 1,0 e 1,0 ml do sangue infectado, respectivamente. Estas aves foram sangradas duas semanas após cada uma das três últimas inoculações e os soros que reagiram com uma linha de precipitação nítida com os antígenos-referência, foram selecionados para sua utilização como soros-referência. Durante a preparação dos antiseros, estas aves foram mantidas em isolamento.

Antisoro conjugado para imunofluorescência

Foi preparado um pool com porções dos soros-referência e as imunoglobulinas foram precipitadas com concentrações decrescentes de sulfato de sódio, conjugadas com fluoresceína de isotiocianato (FITC) e passadas através de uma coluna de cromatografia contendo Sephadex G-25 (Purchase 1973). O antisoro conjugado tinha um título de 1:32 quando testado contra os antígenos-referência na prova de imunodifusão.

Antígenos de referência

A cepa FC-126 do HVT (Witter et al. 1970), foi propagada em culturas de fibroblastos de embrião de galinha livres do vírus da leucose aviária, preparados segundo a técnica descrita por Solomon (1975). O efeito citopático induzido pelo HVT foi confluyente entre os cinco e sete dias após a inoculação e as monocamadas eram desprendidas por agitação no próprio meio de cultura. As células foram imediatamente centrifugadas a 1500 rpm durante 12 minutos a 8-10°C. Os antígenos-referência foram preparados tanto dos sobrenadantes como dos sedimentos celulares. Os sobrenadantes foram colocados em tubos de diálise e concentrados 80 vezes em polietilenoglicol 6000 e finalmente, ressuspensos em água destilada. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em tampão fosfatado salino e padronizados para conter 50 x 10⁶ células por ml. Estas suspensões celulares foram congeladas e descongeladas quatro vezes e utilizadas com ou sem prévia centrifugação, como antígenos de referência celular. Tanto os antígenos preparados dos sobrenadantes como dos sedimentos celulares, reagiram quando confrontados com os soros-referência, com uma linha de precipitação idêntica, na prova de imunodifusão. Os antígenos extraídos de sobrenadantes e de monocamadas de fibroblastos de embrião de galinha não infectados com HVT não reagiram com os soros-referência.

Prova de imunodifusão

Ágar Difco purificado (Difco Laboratories E.U.A.) a 1% em tampão fosfatado salino (NaCl 8,5 g, KCl 0,02 g, Na₂HPO₄ 0,12 g, KH₂PO₄

0,02 g e EDTA di-sódico 0,04 g em 100 ml de água destilada) pH 7,3 foi distribuído uniformemente em lâminas de vidro 75 x 25 mm previamente limpas. Os orifícios no ágar, um central e seis periféricos tinham 3,5 mm de diâmetro e estavam 3,5 mm equidistantes um do outro. O antisoro-referência foi colocado no orifício central e o antígeno-referência nos orifícios periféricos superior e inferior. Os quatro orifícios laterais foram preenchidos com os soros ou com os extratos dos tecidos a serem testados para evidenciar a presença de anticorpos ou antígenos. As lâminas eram incubadas em câmara úmida a temperatura ambiente e a leitura da prova realizada após 24, 48 e 72 horas de incubação. A prova foi considerada válida quando o soro-referência reagia com os antígenos-referência formando uma linha nítida de precipitação. As amostras em teste que apresentavam uma linha de identidade com a linha referência foram consideradas positivas.

Prova de imunofluorescência

Foi desenvolvida uma prova de imunofluorescência direta para detectar antígenos do VDM em esfregaços de sangue e impressões de tecidos. Os esfregaços de sangue e as impressões de baço, bursa de Fabricius, cérebro, fígado, gônadas, pele, rins e timo foram feitos em lâminas de vidro finas, fixadas imediatamente em acetona refrigerada durante quatro minutos e mantidas a 8°C até o momento da prova. As áreas a serem examinadas, duas por lâmina, foram demarcadas com esmalte, lavadas em tampão para imunofluorescência (Becton, Dickinson & Co., E.U.A.) e cobertas com duas gotas de antisoro específico para o VDM, conjugado com FITC e diluído 1:16. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante uma hora, lavadas três vezes em tampão para imunofluorescência e examinadas com microscópio de fluorescência.

Processamento de tecidos para imunodifusão

Durante a necropsia, fragmentos de baço, bursa de Fabricius, cérebro, fígado, gônadas, pontas das penas, rins e timo de duas a três aves do mesmo lote, foram colocados em frascos de vidro contendo 2 ml de uma mistura dos meios de culturas F10 e 199 suplementados com 20% de soro de bezerro e congelados a -70°C até o seu processamento. Os fragmentos foram macerados no mesmo meio de cultura em triturador TenBroeck, congelados e descongelados quatro vezes e centrifugados a temperatura ambiente a 2000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram imediatamente testados para a presença de antígenos ou anticorpos na prova de imunodifusão.

Histopatologia

As aves foram sacrificadas por exanguinação ou por injeção de ar no coração sendo imediatamente necropsiadas para determinar a presença de lesões macroscópicas compatíveis com a forma neural da DM. Fragmentos de baço, bursa de Fabricius, cérebro, fígado, gônadas, nervos dos plexos braquial e ciático e nervos vagos, rins e timo foram fixados

em formalina a 10% e processados para preparar cortes para exame histopatológico por técnicas rotineiras. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e examinados em microscópio simples para verificar a presença de lesões características da DM.

Desenho experimental

Setenta e cinco pintos de um dia de idade foram distribuídos aleatoriamente em três lotes de 25 e identificados individualmente com anel na membrana da asa. As aves do lote 1 foram inoculadas intra-abdominalmente com 0,2 ml da preparação contendo o VDM. As aves do lote 2 não foram inoculadas, mas misturadas com as do lote 1 e criadas juntas no chão, em condições de semi-isolamento. As aves do lote 3 foram criadas em uma área isolada em gaiolas de metal. Três aves de um dia de idade, da mesma eclosão, foram exanguinadas para obtenção de soro. Nas semanas 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 12, duas ou três aves foram retiradas de cada lote. Sangue foi obtido de cada uma tanto em heparina como sem anticoagulante para obtenção de soro. Depois de serem sacrificadas, as aves foram necropsiadas e rotineiramente examinadas macroscopicamente, os nervos vagos e os nervos dos plexos braquial e ciático assim como as gônadas. Fragmentos de baço, rins, bursa de Fabricius, cérebro, fígado, gônadas, timo e pontas de penas retiradas das asas, foram obtidos para preparar impressões para imunofluorescência, cortes histopatológicos e para determinar a presença de anticorpos ou antígenos pela prova de imunodifusão. Todos os soros obtidos foram testados na prova de imunodifusão para detectar anticorpos contra o HVT.

RESULTADOS

Desenvolvimento de anticorpos

Não foram detectados anticorpos de origem materna contra o VDM nos soros das aves sacrificadas no dia da eclosão, quando testados pela prova de imunodifusão. Porém, o "pool" dos soros obtidos das aves de uma semana de idade, inoculadas e em contato, continham anticorpos passivos, os quais não foram mais detectados uma semana depois. Anticorpos ativos foram detectados pela primeira vez, em uma de três aves, quatro semanas após a inoculação. Daí em diante, anticorpos foram consistentemente encontrados nos soros das aves inoculadas, até a 12ª semana, quando o experimento foi encerrado (Quadro 1, Fig. 1). No caso das aves em contato com as aves inoculadas, anticorpos no soro foram inicialmente demonstrados quando as aves tinham oito semanas de idade, sendo a partir daí, encontrados frequentemente até a 12ª semana. Todas as aves testemunhas sem contato com aves infectadas,

Quadro 1. Desenvolvimento de anticorpos^(a) no soro em aves infectadas experimentalmente com o vírus da doença de Marek^(b)

Tipo de infecção	Idade das aves em semanas									Total
	0	1	2	3	4	6	8	10	12	
Inoculação	—	pool + ^(c)	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3	2/3	4/4	13/25 (52,0) ^(d)
Contato	—	pool ++	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3	2/2	7/23 (30,4)
Nenhuma	0/3	pool -	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/8	0/26 (0,0)

(a) Testados na prova de imunodifusão em lâmina.

(b) Aves inoculadas por via intra-abdominal com o vírus da doença de Marek (Inoculação), em coabitação com as aves inoculadas (Contato) e não inoculadas (Nenhuma).

(c) Pool do soro de três pintos fortemente positivo (++), fraco positivo (+) e negativo (-).

(d) Número de aves com anticorpos no soro/número de aves testadas (percentagem com anticorpos).

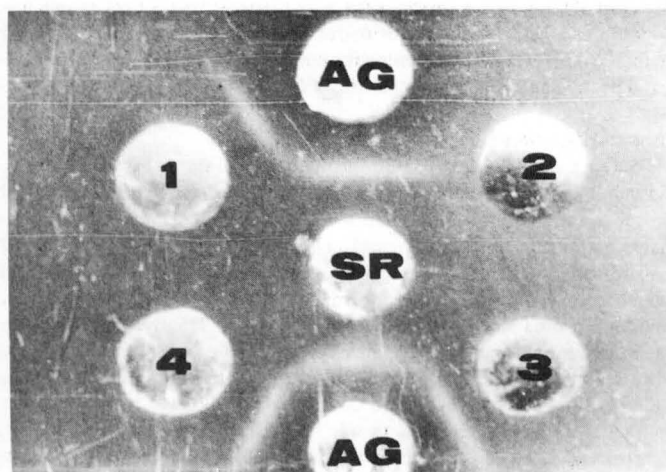


Fig. 1. Prova de imunodifusão em gel de ágar em lâmina para detectar anticorpos contra o vírus da doença de Marek. Ag-Antígeno-referência, Sr=Soro-referência, Orifícios 1, 3 e 4 = Soros com anticorpos contra o VDM, Orifício 2 = Soro livre de anticorpos contra o VDM.

permaneceram livres de anticorpos durante as 12 semanas de experimento. Todavia, todos os soros obtidos foram testados para verificar a presença de anticorpos contra o vírus da doença bursal infecciosa, pela prova de imunodifusão (Weissman & Hitchner 1978), sendo todos resultados negativos (resultados não apresentados).

Distribuição de antígenos virais em órgãos e tecidos

Antígenos do VDM foram detectados no baço e no timo das aves anoculadas de uma semana de idade, utilizando-se a prova direta de imunofluorescência. A fluorescência observada foi caracterizada pela presença de grânulos arredondados e ovais, presentes no citoplasma de células mononucleares e em alguns casos fora delas. Este antígeno viral foi detectado no baço até a sexta semana após a inoculação (Quadro 2). No baço das aves em contato, o antígeno foi inicialmente demonstrado às três semanas de idade e persistiu até a oitava semana, enquanto que jamais foi observado no baço das aves testemunhas. Antígeno viral foi também detectado na bursa de Fabricius das aves inoculadas a partir da segunda semana até a 12ª

Quadro 2. Distribuição de antígenos do vírus da doença de Marek em órgãos e tecidos de aves detectados através da prova direta de imunofluorescência

Idade em semanas	Tipo de infecção (a)	Órgãos e tecidos								
		Baço	Bursa	Cérebro	Fígado	Gônada	Pele	Rim	Sangue(b)	Timo
1	I	+	—	—	—	—	+	—	—	+
	C	—	—	—	—	—	+	—	—	—
	T	—	—	—	—	—	+	—	—	—
2	I	+	+	—	—	—	+	—	2/3	—
	C	—	—	—	—	—	+	—	3/3	—
	T	—	—	—	—	—	+	—	1/2	—
3	I	+	+	—	—	—	+	—	1/3	—
	C	+	—	—	—	—	+	—	1/3	—
	T	—	—	—	—	—	+	—	0/2	—
4	I	+	+	—	—	—	+	—	2/3	—
	C	+	+	—	—	—	+	—	1/3	—
	T	—	—	—	—	—	+	—	0/2	—
6	I	+	—	—	—	—	+	—	1/3	—
	C	+	—	—	—	—	+	—	1/3	—
	T	—	—	—	—	—	+	—	0/2	—
8	I	—	+	—	—	—	+	—	1/3	—
	C	+	—	—	—	—	+	—	2/3	—
	T	—	—	—	—	—	+	—	0/2	—
10	I	—	—	—	—	—	+	—	2/3	—
	C	—	—	—	—	—	+	—	1/3	—
	T	—	—	—	—	—	+	—	0/2	—
12	I	—	+	—	—	—	+	—	0/3	—
	C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	T	—	—	—	—	—	+	—	1/2	—

(a) Aves infectadas (I) com 1 dia de idade por inoculação intra-abdominal com o vírus da doença de Marek, em contato (C) com as aves infectadas e criadas em isolamento como testemunhas (T) não-infectadas.

(b) Número com fluorescência/número de aves testadas.



Fig. 2. Ave de 10 semanas de idade apresentando sintomas característicos da forma neural da doença de Marek.

semana e no mesmo órgão, das aves em contato com quatro semanas de idade. Resultados negativos para antígenos virais foram sempre obtidos nas impressões de cérebro, fígado, gônadas e rins de todas as aves testadas. As impressões de pele e os esfregaços de sangue, exibiam fluorescência não específica, independente da infecção com o VDM.

Distribuição de anticorpos em órgãos e tecidos

Anticorpos contra o HVT foram encontrados consistentemente nos rins e no sangue das aves inoculadas a partir da sexta semana e nas aves em contato, a partir da oitava semana no sangue e nos rins. Estes anticorpos foram também detectados no baço, bursa de Fabricius e gônadas das aves infectadas a partir da 10ª semana enquanto que, no timo e nas pontas das penas, foram demonstrados esporadicamente (Quadro 3). Anticorpos jamais foram encontrados nos tecidos das aves testemunhas. Interessantemente, antígeno específico do VDM foi de-

Quadro 3. Distribuição de anticorpos contra o vírus Herpes de perus em órgãos e tecidos de aves experimentalmente infectadas com uma cepa neural do vírus da doença de Marek

Idade em semanas	Tipo de infecção ^(a)	Órgão e tecidos								
		Baço	Bursa	Cérebro	Fígado	Gônadas	Ponta das penas	Rim	Sangue	Timo
1	I	—	—	—	—	NR	—	*	— (pool de 3)	—
	C	—	—	—	—	NR	—	*	+ (pool de 3)	—
	T	—	—	—	—	NR	—	*	— (pool de 3)	—
2	I	—	—	—	*(b)	NR	*	—	— (0/3)	—
	C	—	—	—	*	NR	—	—	— (0/3)	—
	T	—	—	—	*	NR	—	*	— (0/2)	—
3	I	—	—	—	—	NR	*	*	— (0/3)	—
	C	—	—	—	—	NR	—	*	— (0/3)	—
	T	—	—	—	*	NR	—	*	— (0/2)	—
4	I	—	—	—	—	NR	*	*	— (0/1)	—
	C	—	—	—	—	—	—	*	— (0/3)	—
	T	—	—	—	—	—	—	*	NR	—
6	I	—	—	—	—	—	*** (d)	+	+ (3/3)	—
	C	—	—	—	—	—	*	—	— (0/3)	—
	T	—	—	—	—	—	—	—	— (0/2)	—
8	I	—	—	—	—	—	** (c)	+	+ (3/3)	—
	C	—	—	—	—	—	—	+	+ (3/3)	—
	T	—	—	—	—	—	—	—	— (0/2)	—
10	I	+	+	—	—	+	**	+	+ (2/3)	+
	C	—	—	—	—	—	+	+	+ (3/3)	—
	T	—	—	—	—	—	—	—	— (0/2)	—
12	I	+	+	—	—	+	*	+	+ (3/3)	—
	C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	T	—	—	—	—	—	—	—	— (0/2)	—

(a) Aves infectadas (I) com 1 dia de idade por inoculação intra-abdominal com o vírus da doença de Marek, em contato (C) com as aves infectadas e criadas em isolamento como testemunhas (T) não infectadas.

(b) Reagiu contra o soro-padrão.

(c) Reagiu contra o soro-padrão e rim com anticorpos.

(d) Reagiu contra o soro-padrão, rim, baço e bursa com anticorpos.

monstrado a partir da 2ª semana nos extratos preparados das pontas das penas de aves inoculadas e nas aves em contato com seis semanas de idade. Uma antigenicidade de natureza desconhecida foi encontrada nos rins e no fígado das aves até a quarta semana de idade, independentemente da infecção com o VDM.

Lesões macroscópicas

Durante o transcurso do experimento, quatro aves desenvolveram sintomas clínicos característicos da forma neural da DM evidenciados pela paralisia das pernas (Fig. 2). Duas aves de 5 e 10 semanas de idade tinham sido inoculadas enquanto que, outras duas aves de 10 e 11 semanas de idade haviam estado em contato com as aves inoculadas. Espessamento e co-

loração amarelada dos nervos vagos e dos plexos braquial e ciático foram observados durante a necropsia das últimas três aves.

Lesões microscópicas

Lesões microscópicas características da DM foram observadas principalmente nos nervos vagos, plexos braquial e ciático, pele e rins das aves inoculadas. As lesões foram inicialmente encontradas duas semanas após a inoculação, na pele e nos rins, as quais se caracterizavam por uma infiltração de linfócitos, plasmócitos e linfoblastos, algumas vezes dando lugar ao aparecimento de focos linfoproliferativos (Fig. 3). Infiltrações linfocitárias foram observadas nos nervos das aves inoculadas a partir da quarta semana. Estas lesões eram classificadas como

Quadro 4. Distribuição de lesões microscópicas nos diversos tecidos de aves infectadas experimentalmente com o vírus da doença de Marek

Idade em semanas	Tipo de infecção ^(a)	Órgãos e tecidos								Nervos		
		Baço	Bursa	Cérebro	Fígado	Gônada	Pele	Rim	Timo	Braquial	Ciático	Vago
1	I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	I	—	—	—	—	—	+++ ^(e)	++++ ^(f)	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	I	—	—	—	—	—	+++	++++	—	—	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	I	—	—	—	—	—	+++	++++	—	—	B	—
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	I	—	—	—	FL	—	+++	++++	—	—	—	AC
	C	—	—	—	—	—	—	++++	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	I	—	—	—	—	—	—	++++	—	—	AB	A
	C	—	—	—	FL	—	+++	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	FL	—	—	—	—	—	—	—
10	I	—	+ ^(b)	FL ^(c)	FL	++ ^(d)	—	—	+++++ ^(g)	—	B	—
	C	—	—	FL	—	—	—	—	—	—	B	B
	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	I	—	+	—	FL	—	—	—	—	B ^(h)	—	B
	C	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	T	—	—	—	FL	—	—	—	—	—	—	—

(a) Aves inoculadas com 1 dia de idade por via intra-abdominal com o vírus da doença de Marek (I), em coabitação com as aves inoculadas (C) e testemunhas (T) não inoculadas.

(b) Despovoamento linfóide e degeneração cística dos folículos bursais e infiltração linfocítica interfolicular.

(c) Focos de proliferação linfóide.

(d) Abundante infiltração de plasmócitos e alguns linfócitos, linfoblastos e células de Marek.

(e) Proliferação de linfoblastos, linfócitos e plasmócitos no folículo da pena.

(f) Infiltração intertubular de linfócitos, plasmócitos, células de Marek e/ou presença de focos linfoproliferativos.

(g) Despovoamento e degeneração cística dos folículos.

(h) Lesões linfoproliferativas de tipo A, B, C ou mistas.

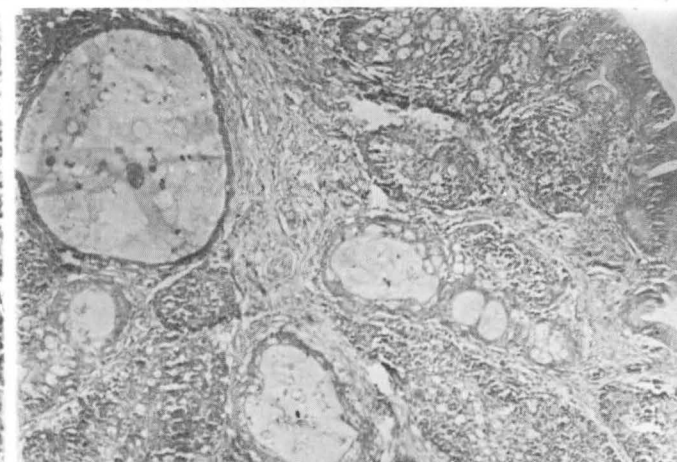
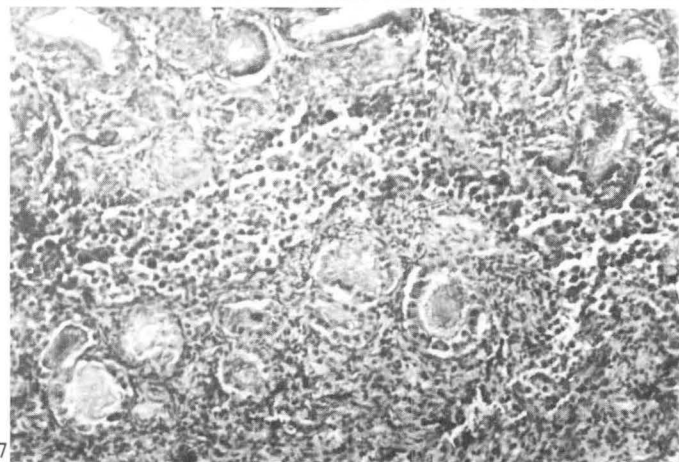
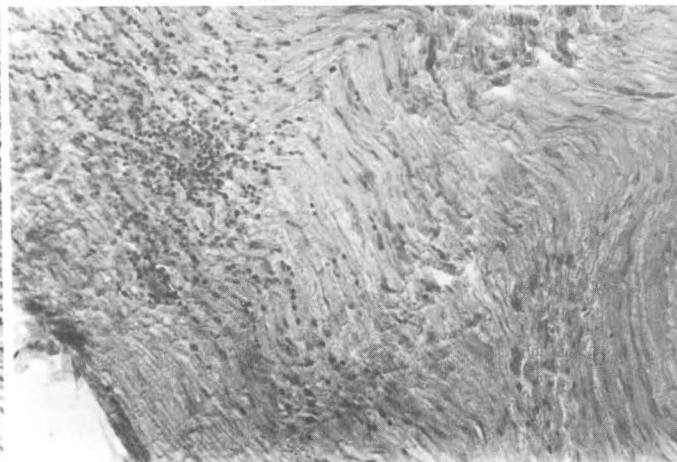
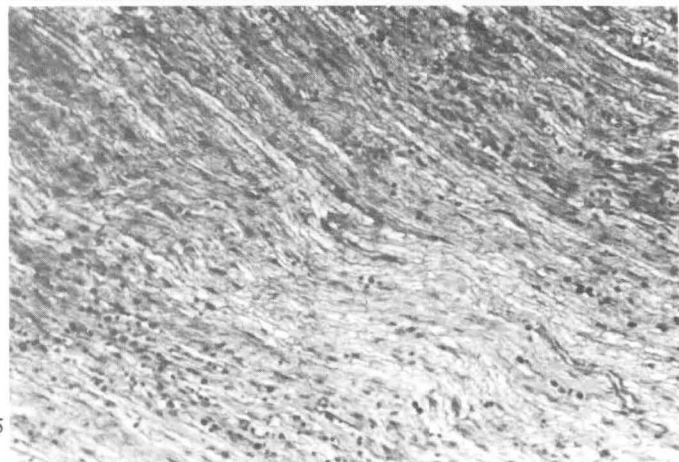
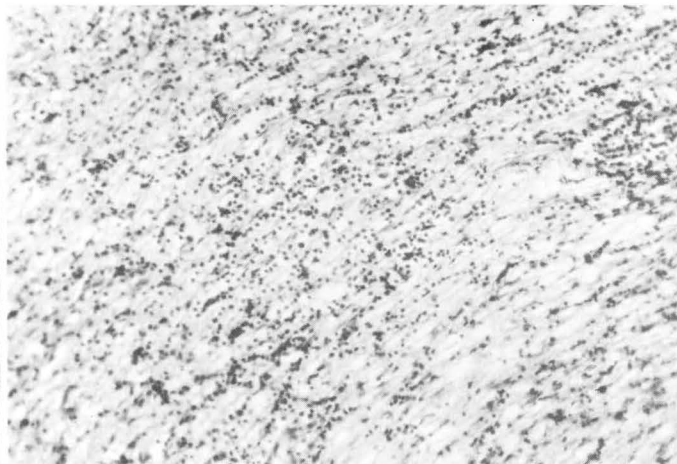
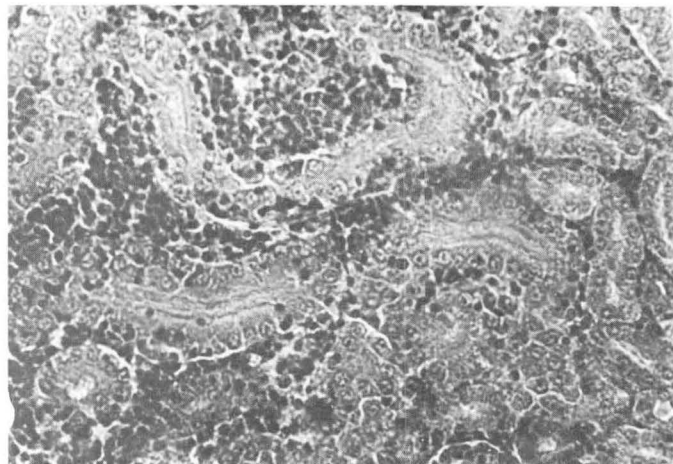


Fig. 3. Corte histológico de rim de uma ave inoculada com o VDM mostrando uma infiltração de células mononucleares entre os túbulos renais. H.-E., 200x.

Fig. 5. Corte histológico de nervo do plexo ciático de ave inoculada com o VDM mostrando edema interneural, proliferação de células de Schwann, linfócitos médios e pequenos e plasmócitos. Lesão classificada como tipo B. H.-E., 100x.

Fig. 7. Corte histológico de gônada de ave inoculada com o VDM mostrando infiltração de células mononucleares. H.-E., 100x.

Fig. 4. Corte histológico de nervo do plexo ciático de ave inoculada com o VDM mostrando uma infiltração difusa de linfócitos, plasmócitos e linfócitos e edema interneural característicos de uma lesão mista do tipo AB. H.-E., 100x.

Fig. 6. Corte histológico de nervo do plexo ciático de ave inoculada com o VDM mostrando infiltração focal de pequenos linfócitos e proliferação de células de Schwann. Lesão classificada como tipo C. H.-E., 100x.

Fig. 8. Corte histológico de bursa de Fabricius de ave inoculada com o VDM mostrando despovoamento linfóide e degeneração cística dos folículos bursais. H.-E., 60x.

sendo do tipo A, B, C, ou uma combinação delas (Fig. 4, 5 e 6), conforme Payne e Biggs (1967). Despovoamento linfóide e degeneração cística dos folículos foram observados no timo de uma ave inoculada de 10 semanas de idade, enquanto que, nas gônadas foi observada uma infiltração de plasmócitos, linfócitos, linfoblastos e células de Marek (Fig. 7). Lesões caracterizadas por despovoamento linfóide e degeneração cística dos folículos bursais, assim como infiltração mononuclear interfolicular foram visualizadas na bursa de Fabricius de aves inoculadas de 10 e 12 semanas de idade (Fig. 8).

Lesões microscópicas nos tecidos das aves em contato com as aves inoculadas foram observadas nos rins de uma ave com 6 semanas, na pele de uma ave com 8 semanas e nos nervos de aves com 10 semanas.

Pequenos focos linfóides foram observados em algumas amostras de cérebro e fígado, independentemente da infecção com o VDM. Estes focos eram exclusivamente constituídos de pequenos linfócitos. Todas as aves testemunhas mantiveram-se livres de lesões microscópicas, atribuídas ao VDM, durante o transcurso do experimento (Quadro 4).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, apesar de terem sido selecionadas matrizes livres de anticorpos no soro, comumente ensaiados na prova de imunodifusão (Chubb & Churchill 1968), anticorpos precipitantes de origem materna foram detectados no soro de algumas aves de uma semana de idade, mas não no soro de aves com duas semanas. Estes achados são basicamente explicados pelo fato da prova de imunodifusão, apesar de ser altamente específica para o VDM, não é tão sensível como por exemplo a prova de imunofluorescência (Purchase & Burgoyne 1970). Algumas matrizes "falsamente negativas" poderiam ter concentrado os anticorpos para o VDM na gema do ovo, os quais quando absorvidos pelos pintos recém-nascidos, foram detectados com uma semana de idade. Os anticorpos neutralizantes de origem materna, poderiam ter interferido com o rápido estabelecimento e disseminação da infecção nas aves inoculadas, o que poderia ter sido responsável pela baixa proporção de aves com anticorpos precipitantes quatro semanas após a inoculação experimental. Este fenômeno poderia ter-se agravado nas aves em contato com as aves inoculadas, devido a natureza quantitativamente menor e tardia da agressão natural. A falta de anticorpos contra o VDM nas aves testemunhas demonstraram que as medidas de contenção adotadas no presente estudo, foram suficientes para evitar uma contaminação acidental.

Os estudos de transmissão experimental com a cepa do VDM utilizada nestes experimentos, demonstraram que esta cepa induziu a formação de anticorpos, os quais foram detectados em algumas aves a partir da quarta semana após a inoculação intra-abdominal, encontrando-se estes às 12 semanas de idade em 100% das aves inoculadas e em contato.

Os resultados das provas de imunofluorescência indicaram que a cepa do VDM estudada replica-se inicialmente em células mononucleares, provavelmente em linfócitos. Apesar da fluorescência ter sido observada no baço das aves experimen-

talmente infectadas tão cedo como uma semana após a inoculação do VDM e daí em diante, até a sexta semana, poucas foram as células nas quais observou-se esta imunofluorescência.

O achado de imunofluorescência no timo de aves infectadas somente uma semana após a infecção experimental e a sua total ausência até a 12ª semana, poderia indicar que este órgão permitiria uma replicação inicial do VDM porém, sendo logo a infecção rechaçada deste tecido. Por outro lado, a bursa de Fabricius parece fornecer continuamente as células-alvo necessárias para a replicação do VDM, desde que a imunofluorescência foi positiva até a 12ª semana, nas aves inoculadas. Esta fluorescência foi também detectada em aves de quatro semanas de idade, em contato com as aves inoculadas, o que indica que estas aves, apesar de não terem desenvolvido anticorpos, já estavam infectadas. Evidência similar de replicação de cepas do VDM, tais como a JM e a RPL 39, foi obtida por Purchase (1970), que demonstrou antígeno viral na bursa de Fabricius, cinco dias após a inoculação e daí em diante, esporadicamente, até o último teste às seis semanas. Já este pesquisador, visualizou fluorescência no timo também esporadicamente, entre a primeira e sexta semana após a inoculação, enquanto que poucas aves inoculadas possuíam células fluorescentes no baço. Estas diferenças na localização de antígenos virais, poderiam indicar propriedades de tropismo celular na replicação viral de cada cepa do VDM. Este raciocínio é reforçado pelo conhecimento da existência de cepas com tropismo neural (Sevoian et al. 1962) e visceral (Eidson & Schmittle 1968).

A negatividade das impressões de cérebro e fígado, indicam que estes órgãos não participam da patogenia da infecção da cepa estudada. Resultados idênticos foram obtidos por Purchase (1970) após a infecção com a cepa neural JM. As impressões de pele e os esfregaços de sangue forneceram resultados equívocos de imunofluorescência, devido à fluorescência não específica das células componentes destes tecidos.

Extratos de órgãos e tecidos de aves infectadas com a cepa do VDM, continham algumas vezes anticorpos específicos detectáveis na prova de imunodifusão. Assim, o baço, a bursa de Fabricius, as gônadas, os rins e o timo de aves inoculadas de 10 e 12 semanas de idade, reagiram com uma linha de precipitação quando confrontados com os antígenos de referência. Estes anticorpos parecem ser específicos para o antígeno "A" produzido por células infectadas com o HVT ou com o VDM (Chubb & Churchill 1968). O significado da presença desses anticorpos nos tecidos de aves infectadas com o VDM, é por enquanto desconhecido desde que, este fenômeno jamais tinha sido descrito. A origem dos mesmos e a localização dentro de cada um dos tecidos são também desconhecidos e futuras pesquisas nesta área, poderão fornecer informações sobre uma possível participação da imunidade humoral ou de complexos imunes, localizados nestes tecidos, no desenvolvimento do processo tumoral. A presença de anticorpos em órgãos como o baço e os rins poderia ser simplesmente explicada, pela rica vascularização destes órgãos e alto conteúdo de imunoglobulinas no sangue circulante. Já no caso da bursa de Fabricius, gônadas, pontas das penas e timo, esta explicação é altamente improvável devido às características diferentes destes tecidos. Nós

hipotetizamos que a presença destes anticorpos poderia obedecer ao estabelecimento de complexos imunes, que eventualmente resultarão no aparecimento de um processo inflamatório de natureza linfo-proliferativa e que poderia se tornar tumoral, devido a persistência da reação imune.

Sintomas clínicos característicos da doença de Marek foram observados somente em quatro aves, provavelmente devido a natureza do desenho experimental, que não permitiu a manutenção de todas as aves durante as 12 semanas, tempo considerado mais do que suficiente para a expressão da doença de Marek (Spencer 1969). Os sintomas clínicos observados nas quatro aves doentes, foram característicos e correspondiam à forma neural da doença de Marek. Os achados macroscópicos nestas quatro aves, correspondiam a espessamento e perda das estrias dos nervos vago e dos nervos dos plexos braquial e ciático. A especificidade das lesões foi confirmada microscopicamente ao encontrar-se lesões infiltrativas e proliferativas contendo linfócitos de diversos tamanhos, plasmócitos e linfoblastos. Tanto estas lesões como as lesões microscópicas encontradas em algumas aves infectadas, sem sintomas clínicos ou lesões macroscópicas, correspondiam a lesões do tipo A, B, C ou uma combinação delas, previamente descritas por Payne e Biggs (1967). O achado de lesões microscópicas nos nervos somente a partir da quarta semana após a infecção, indicaria que estes tecidos, cronologicamente, não são os primeiros a serem atingidos, desde que lesões microscópicas caracterizadas pela presença de linfócitos, plasmócitos e linfoblastos foram observadas duas semanas após a infecção experimental, tanto na pele como nos rins. O epitélio dos folículos das penas parece ser o único local de replicação completa do VDM (Calnek et al. 1970) e desta forma, o achado de lesões a nível de pele é facilmente explicável. Por outro lado, as infiltrações de células mononucleares entre os túbulos renais, sugeriria um certo grau de lesão renal, talvez mediada por anticorpos, os quais estavam presentes em extratos dos rins destas aves. A cepa do VDM estudada parece ser pouco patogênica e com limitado efeito citolítico sobre o baço, a bursa de Fabricius e o timo, órgãos linfóides geralmente atingidos durante as primeiras semanas de infecção.

Conclui-se que o VDM avaliado na presente pesquisa, produz sintomas clínicos, lesões macro e microscópicas, características da forma neural da doença de Marek, estimula o desenvolvimento de anticorpos no soro, dissemina-se horizontalmente infectando aves em contato e nas aves infectadas, dá origem a antígenos virais e anticorpos detectáveis em extratos de seus tecidos, utilizando-se a prova de imunofluorescência e de imunodifusão, respectivamente.

Agradecimentos.- Agradecemos a Cenira Pereira de Almada e Antônio Lúcio Gomes de Souza pela valiosa assistência técnica e ao Prof. Francisco Rangel Filho pela revisão deste manuscrito.

REFERÊNCIAS

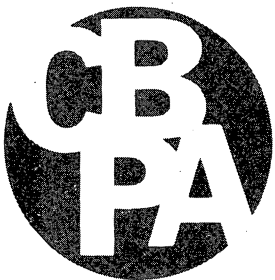
- Bülow V. von & Biggs P.M. 1975. Precipitating antigens associated with Marek's disease viruses and a herpesvirus of turkeys. *Avian Pathol.* 4: 147-162.
- Calnek B.W., Addinger H.K. & Kahn D.E. 1970. Feather follicle epithelium: A source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis.* 14: 219-233.
- Calnek B.W. & Witter R.L. 1978. Marek's disease. In: *Diseases of Poultry*. 7ª ed., p. 385-418.
- Chubb R.C. & Churchill A.E. 1968. Precipitating antibody associated with Marek's disease. *Vet. Rec.* 83: 4-7.
- Churchill A.E. & Biggs P.M. 1967. Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature* 215: 528-530.
- Eidson C.S. & Schmitt S.C. 1968. Studies on acute Marek's disease. I. Characteristics of isolate GA. *Avian Dis.* 12: 467-476.
- Marek J. 1907. Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 15: 417-421.
- Nazerian K., Solomon J.J., Witter R.L. & Burmester B.R. 1968. Studies on the etiology of Marek's disease. II. Finding of a herpesvirus in cell culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127: 177-182.
- Payne L.N. & Biggs P.M. 1967. Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.* 39: 281-302.
- Purchase H.G. 1970. Virus-specific immunofluorescent and precipitin antigens and cell-free virus in the tissues of birds infected with Marek's disease. *Cancer Res.* 30: 1898-1908.
- Purchase H.G. 1973. Fluorescent-antibody techniques in avian research. *Avian Dis.* 17: 213-226.
- Purchase H.G. & Biggs P.M. 1967. Characterization of five isolates of Marek's disease. *Res. Vet. Sci.* 8: 440-449.
- Purchase H.G. & Burgoyne G.H. 1970. Immunofluorescence in the study of Marek's disease: Detection of antibody. *Am. J. Vet. Res.* 31: 117-123.
- Sevoian M., Chamberlain D.M. & Counter F.T. 1962. Avian lymphomatosis. I. Experimental reproduction of the neural and visceral forms. *Vet. Med.* 57: 500-501.
- Solomon J.J. 1975. Preparation of avian cell cultures. *Tiss. Cult. Ass. Man.* 1: 7-11.
- Solomon J.J., Witter R.L., Nazerian K. & Burmester B.R. 1968. Studies on the etiology of Marek's disease. I. Propagation of the agent in cell culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127: 173-177.
- Spencer J.L. 1969. Marek's disease herpesvirus: In vivo and in vitro infection of kidney cells of different genetic strains of chickens. *Avian Dis.* 13: 753-761.
- Stone H.A. 1975. Use of highly inbred chickens in research. *A.R.S., U.S.D.A., Technical Bulletin* 1514, p. 1-22.
- Weisman J. & Hitchner S.B. 1978. Infectious bursal disease virus infection attempts in turkeys and Coturnix quail. *Avian Dis.* 22: 604-609.
- Witter R.L. 1982. Protection by attenuated and polyvalent vaccines against highly virulent strains of Marek's disease virus. *Avian Pathol.* 11: 49-62.
- Witter R.L. & Burmester B.R. 1979. Differential effect of maternal antibodies on efficacy of cellular and cell-free Marek's disease vaccines. *Avian Pathol.* 8: 145-156.
- Witter R.L., Nazerian K., Purchase H.G. & Burgoyne G.H. 1970. Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 31: 525-538.
- Witter R.L., Sharma J.M. & Fadly A.M. 1980. Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. *Avian Dis.* 24: 210-232.

ISSN 0100-736X

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Brazilian Journal of Veterinary Research

VOLUME 3, 1983



Revista do Colégio Brasileiro de Patologia Animal

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

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

É revista 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. Como complemento traz resumos dos trabalhos de ciências veterinárias recentemente publicados no Brasil.

O Colégio Brasileiro de Patologia Animal, inicialmente, está recebendo um auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para editar a revista que, gradativamente, deve tornar-se financeiramente independente através de publicidade e assinaturas.

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 wellcomed. Reviews should be written in support of original investigations. The editors assume that papers submitted are not being considered for publication in other journals and do not contain material which has already been published.

Editor: Jürgen Döbereiner, *Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23460, Brasil.*

Editores Assistentes: Oswaldo Duarte Gonçalves, Cheryl Ann Rowe, Fernando Cordeiro

Editores Adjuntos: Severo Sales de Barros, *Santa Maria*
Osmane Hipólito, *São Paulo*
Jerome Langenegger, *Rio de Janeiro*
Hugo Barbosa de Rezende, *Rio de Janeiro*
Adayr Mafuz Saliba, *São Paulo*
Jefferson Andrade dos Santos, *Niterói*
Carlos Hubinger Tokarnia, *Rio de Janeiro*

Assessoria Científica (Advisory Board)

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

Este volume foi publicado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

SUMÁRIO

List of Contents

Vol. 3, No. 1, Jan./Mar. 1983

Biologia e susceptibilidade de <i>Lymnaea cubensis</i> (Mollusca, Lymnaeidae) a infecções por <i>Fasciola hepatica</i> em condições experimentais. [Biology and susceptibility of <i>Lymnaea cubensis</i> (Mollusca, Lymnaeidae) to infection with <i>Fasciola hepatica</i> .] S. Nuernberg, H.E.B. Rezende, N.M.S. Freire, P.A.C. Gomes & J.L.B. Araujo	1-10
A comparison of productivity traits of dams, shedders and non-shedders of the group-specific antigen of avian lymphoid leukosis viruses and their progeny. [Comparação nos parâmetros de produtividade de matrizes, eliminadoras e não eliminadoras do antígeno específico de grupo dos vírus da leucose linfóide aviária e de sua progênie.] C.H. Romero, C.A. Rowe, P.G.O. Dias, O.A. Resende, M.W. Santos & J.M.L. Monteiro	11-16
Intoxicação por <i>Arrabidaea bilabiata</i> (Bignoniaceae) em bovinos na região Amazônica do Brasil. [Poisoning of cattle by <i>Arrabidaea bilabiata</i> (Bignoniaceae) in the Amazon region of Brazil.] J. Döbereiner, C.H. Tokarnia & M.F. Silva	17-24
Concentração plasmática de estrógeno total e progesterona, determinada por radioimunoensaio em vacas em trabalho de parto, relacionada com o tipo de intervenção obstétrica. [Plasma concentration of total estrogen and progesterone as determined by radioimmunoassay in cows at parturition, in relation to the type of obstetrical intervention.] E.D.F. Silva	25-28
<i>Raillietia caprae</i> (Acari: Mesostigmata) em caprinos e ovinos no Brasil. [<i>Raillietia caprae</i> (Acari: Mesostigmata) in goats and sheep in Brazil.] A.H. Fonseca, J.L.H. Faccini & C.L. Massard	29-31
Resumos 1-18	33-36

Vol. 3, No. 2, Abr./Jun. 1983

Polioencefalomalácia em bovinos no Rio Grande do Sul. [Polioencephalomalacia in cattle in Rio Grande do Sul, Brazil.] M.N. Santos, J.O. Jardim Filho & F.A. Grando	37-39
Atrophic rhinitis of swine: effect of vaccination against <i>Bordetella bronchiseptica</i> in piglets challenged at an early age. [Rinite atrófica dos suínos: efeito da vacinação contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> em leitões desafiados nos primeiros dias de vida.] J.R. F. Brito, M.A.V.P. Brito, N. Mores & I.A. Piffer	41-44
Intoxicação experimental por <i>Vernonia squarrosa</i> (Compositae) em ovinos e bovinos. [Experimental poisoning of sheep and cattle by <i>Vernonia squarrosa</i> (Compositae).] C.H. Tokarnia & J. Döbereiner	45-52
Polimorfismo da transferrina sérica em bovinos da raça Canchim. [Transferrin polymorphism in Canchim cattle.] J. Bortolozzi	53-57
Intoxicação por <i>Claviceps paspali</i> em bovinos no Rio Grande do Sul. [Intoxication by <i>Claviceps paspali</i> in cattle in Southern Brazil.] F. Riet-Correa, A.L. Schild, M.C. Menezes, A.S. Tavares & J.O. Rodrigues	59-65
Histological investigations of the periodontal disease "cara inchada" in cattle. [Estudos histológicos da doença peridentária "cara inchada" dos bovinos.] K. Seifert, P. Walter, J. Döbereiner & I. Rüsse	67-70
Resumos 19-37	71-74

ISSN 0100-736X

Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro, v. 3, p. 1-146, 1983

Intoxicação por <i>Palicourea aeneofusca</i> (Rubiaceae), a causa de "mortes súbitas" em bovinos na Zona da Mata de Pernambuco. [Poisoning by <i>Palicourea aeneofusca</i> (Rubiaceae), a cause of "sudden death" of cattle in the forest region of Pernambuco.] <i>C.H. Tokarnia, J. Döbereiner, J.E.M. Couceiro & A.C.C. Silva</i>	75-79
Surto de febre catarrhal maligna em bovinos no Rio Grande do Sul. [An outbreak of malignant catarrhal fever in cattle in Rio Grande do Sul.] <i>S.S. Barros, M.N. Santos & C.S.L. Barros</i>	81-86
Isolation and characterization of a reaginic antibody from pigs infected with <i>Ascaris suum</i>. [Isolamento e caracterização de um anticorpo reagínico de suínos infectados com <i>Ascaris suum</i>.] <i>R.M. Martins</i>	87-90
Salmonelas isoladas de suínos de abate do Estado do Pará. [Salmonellae from slaughtered pigs of Pará, Brazil.] <i>C.H. Langenegger, J. Alfinito & J. Langenegger</i>	91-94
Intoxicação experimental por <i>Arrabidaea japurensis</i> (Bignoniaceae) em coelhos. [Experimental poisoning by <i>Arrabidaea japurensis</i> (Bignoniaceae) in rabbits.] <i>J. Döbereiner & C.H. Tokarnia</i>	95-97
Resumos 38-54	99-102

Transferência de embriões em bovinos pelos métodos cirúrgico e não cirúrgico. [Surgical and non-surgical embryo transfer in cattle.] <i>M.I.B. Rubin, C.P.D. Costa, C.S. Pinto, J.L. Rodrigues, R.M. Gregory, J. Hahn & A.M. Silva</i>	103-106
Poluição industrial como causa de intoxicação por flúor em bovinos no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul. [Industrial pollution as a cause of fluoride intoxication in cattle in the municipality of Rio Grande, southern Brazil.] <i>F. Riet-Correa, J.A. Oliveira, M.D.C. Méndez & A.L. Schild</i>	107-114
Intoxicação experimental por <i>Crotalaria anagyroides</i> (Leg. Papilionoideae) em bovinos. [Experimental poisoning of cattle by <i>Crotalaria anagyroides</i> (Leg. Papilionoideae).] <i>C.H. Tokarnia & J. Döbereiner</i>	115-123
Prevalência do vírus da leucose enzoótica bovina no rebanho leiteiro do Paraná. [Prevalence of enzootic bovine leukosis virus in dairy cattle in Parana.] <i>C.E. Kantek, E.R. Kruger & V.R. Welte</i>	125-129
Patogenicidade de uma cepa do vírus herpes da doença de Marek. [Pathogenicity of a strain of Marek's disease herpes virus.] <i>L.F.C.G. Vianna & C.J. Romero</i>	131-139
Resumos 55-82	141-146

ÍNDICE DOS AUTORES

Author Index

- | | | | |
|---------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|
| Alfinito J. 91 | Gomes P.A.C. 1 | Mores N. 41 | Santos M.N. 37, 81 |
| Araujo J.L.B. 1 | Grando F.A. 37 | Noernberg S. 1 | Santos M.W. 11 |
| Barros C.S.L. 81 | Gregory R.M. 103 | Oliveira J.A. 107 | Schild A.L. 59 |
| Barros S.S. 81 | Hahn J. 103 | Piffer I.A. 41 | Seifert K. 67 |
| Bortolozzi J. 53 | Jardim Filho J.O. 37 | Pinto C.S. 103 | Silva A.C.C. 75 |
| Brito J.R.F. 41 | Kantek C.E. 125 | Resende O.A. 11 | Silva A.M. 103 |
| Brito M.A.V.P. 41 | Kruger E.R. 125 | Rezende H.E.B. 1 | Silva E.D.F. 25 |
| Costa C.P.D. 103 | Langenegger C.H. 91 | Riet-Correa F. 59 | Silva M.F. 17 |
| Couceiro J.E.M. 75 | Langenegger J. 91 | Rodrigues J.L. 103 | Tokarnia C.H. 17, 45, |
| Dias P.G.O. 11 | Martins R.M. 87 | Rodrigues J.O. 59 | 75, 95 |
| Döbereiner J. 17, 45, 67, | Massard C.J. 29 | Romero C.H. 11 | Vianna L.F.C.G. 131 |
| 75, 95 | Mendez M.C. 59 | Rubin M.I.B. 103 | Walter P. 67 |
| Faccini J.L.H. 29 | Mendez M.D.C. 107 | Rowe C.A. 11 | Welte V.R. 125 |
| Freire N.M.S. 1 | Monteiro J.M.L. 11 | Rüsse I. 67 | |

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos, em original e *uma* cópia, escritos em português ou inglês, devem ser enviados ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Colégio Brasileiro de Patologia Animal, 23460 Seropédica, Rio de Janeiro. Devem constituir-se de resultados ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

j) a lista de *Referências*, que só incluirá a bibliografia citada no tra-

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

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

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

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

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

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

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

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

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

cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

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

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

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

COLÉGIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA ANIMAL

Fundado em 28 de setembro de 1978
Diretoria e Conselho 1980/83

Presidente : Jürgen Döbereiner, *Embrapa – Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23460.*

Vice Presidente : Hugo Barbosa de Rezende, *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, RJ 23460.*

Primeiro Secretário : Jerome Langenegger, *Embrapa – Unidade Pesq. Patol. Animal, Km 47.*

Segundo Secretário : Laerte Grisi, *Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro.*

Primeiro Tesoureiro : Carlos Hubinger Tokarnia, *Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro.*

Segundo Tesoureiro : Rubens Pinto de Mello, *Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro.*

Conselheiros : Jefferson Andrade dos Santos, *Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho 64, Niterói, RJ 24230.*

Hermann Gonçalves Schatzmayr, *Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil 4365, Cx. Postal 926, Manguinhos, Rio de Janeiro 21040.*

Michael Robin Honer, *Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro.*

SÓCIOS EMÉRITOS *em homenagem póstuma*

Fúlvio José Alice
Paulo Dacorso Filho
Mario D'Apice
Octávio Dupont
Moacyr Gomes de Freitas
Antonio Francisco Matera
Wilhelm Otto Neitz
Adolpho Martins Penha
Sylvio Torres

A assinatura anual da Pesquisa Veterinária é feita através de remessa do cupom inserido em cada número da revista, de acordo com as instruções impressas.

Annual subscription of Pesquisa Veterinária Brasileira is made by completing the form inserted in each issue of the journal, according to the instructions.