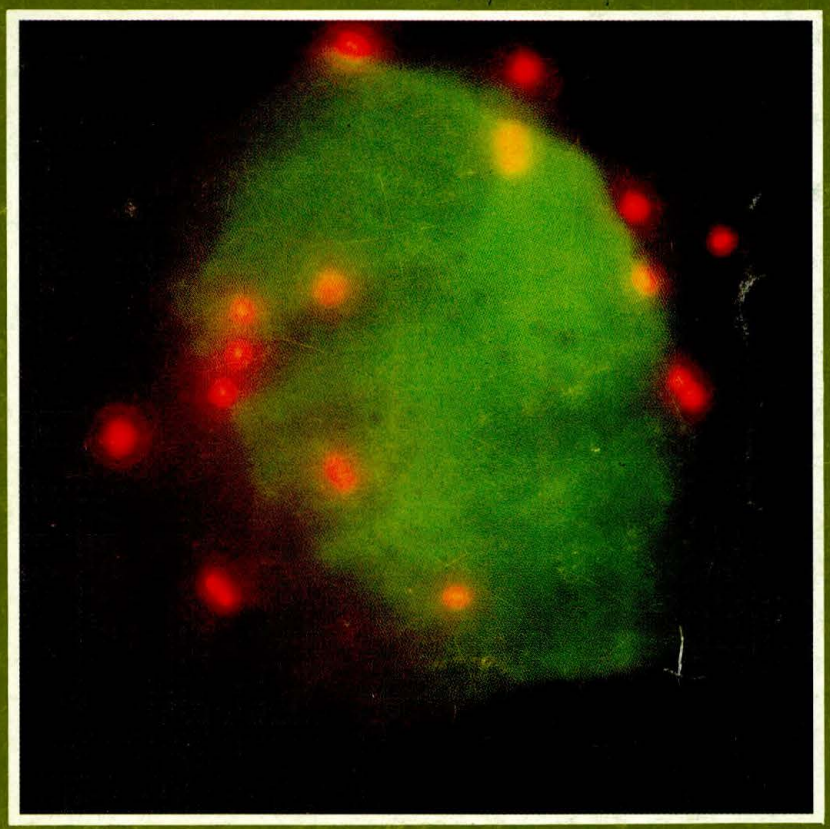
ISSN 0100-736X

Volume 16 Números 2/3
Abr/Set 1996

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Brazilian Journal of Veterinary Research



Revista do Colégio Brasileiro de Patologia Animal

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, revista bilíngüe trimestral, editada pelo Colégio Brasileiro de Patologia Animal, publica trabalhos originais de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública. Os autores devem fazer com que seus trabalhos, quando a ela destinados, sejam preparados 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 and of interest to Public Health, are particularly welcomed. Reviews should be written in support of original investigation. The editors assume that papers submitted are not being considered for publication in other journals and do not contain material which has already been published.

Conselho Editorial (*Editorial Board*)

Editor: Jürgen Döbereiner. **Editores Adjuntos**: Severo Sales de Barros, Jerome Langenegger, Hugo Barboza de Rezende, Jefferson Andrade dos Santos, Carlos Hubinger Tokarnia.

Assessoria Científica (*Advisory Board*)

Carlos Cypriano P. Arteche, 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, Hans Merkt, Gonzalo E. Moya, Ronaldo Reis, Carlos H. Romero, Ivan B. Machado Sampaio, Hermann G. Schatzmayr, L.-Cl. Schulz.

A correspondência referente à publicação de trabalhos e a outros assuntos técnico-científicos editoriais deve ser endereçada ao (*All editorial communications, including typescripts, should be addressed to*) Dr. Jürgen Döbereiner, Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970 (Brasil); Tel. (021) 682-1082; Fax (021) 682-1109.

A revista é editada dentro do

Programa de Apoio a Publicações Científicas

MCT/PR CNPq FINEP

em colaboração com o
Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ

Figura da capa: Aderência de *Bacteroides melaninogenicus*, previamente tratados com doses subinibitórias de estreptomicina, a uma célula epitelial da mucosa da gengiva maxilar de bovino zebu (Coloração de acridinorange, obj. 100). O possível aumento do número de Actinomicetos, produtores de estreptomicina, em solos recém-cultivados de áreas de mata ou cerrado, pode ser fator desencadeante da periodontite da "cara inchada" dos bovinos, doença infecciosa causada sobretudo por *B. melaninogenicus* em conjunto com *Actinomyces pyogenes*. (Kopp et al., p. 53)

Cover illustration: Adherence of Bacteroides melaninogenicus, *treated before with subinibitory concentrations of streptomycin, at an epithelial cell of the maxillary gingiva of a bovine of the zebu breed (Acridinorange stain, obj. 100). A possible increase of the number of Actinomycetes producing streptomycin in recently cultivated soils in former forest or savanna areas, could be a determinant factor for the periodontitis of "cara inchada" in young cattle, caused mainly by* B. melaninogenicus *together with* Actinomyces pyogenes. (Kopp et al., p. 53)

ISSN 0100-736X

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

- revista editada pelo Colégio Brasileiro de Patologia Animal
A Brazilian Journal of Veterinary Research published by the Brazilian College of Animal Pathology

Volume 16 Abril/Setembro 1996 Números 2/3

SUMÁRIO

Pesquisa de anticorpos contra Brucella ovis em ovinos do Estado de São Paulo. *Marcia Marinho & Luis Antonio Mathias* 45-48

Comparação entre o uso de tripaflavina e dimetridazole no tratamento da tricomonose bovina. *V.L.T. Jesus, H.G. Guida, V.L.B. Andrade, N.M. Serra-Freire, A.A. Ramos & E.B.B. Pereira* 49-51

Estreptomicina aumenta a aderência em células epiteliais de Bacteroides melaninogenicus associado às lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *P.A. Kopp, I.S. Dutra, J. Döbereiner, M. Schmitt, B. Grassmann & H. Blobel* 53-57

Intoxicação experimental pelas sementes de Abrus precatorius (Leg. Papilionoideae) em ovinos. *M.F. Brito, A.G. Armién & C.H. Tokarnia* 59-66

Epidemiologia e quadro clínico do botulismo epizoótico dos bovinos no Estado de São Paulo. *J.A.N. Lisbôa, M.R.G. Kuchembuck, I.S. Dutra, R.C. Gonçalves, C.T. Almeida & I.R. Barros Filho* 67-74

Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. *A. Magalhães Neto & C. Gil-Turnes* 75-79

Ultra-estrutura das alterações ósseas na intoxicação experimental por Solanum malacoxylon em coelhos. *S.S. Barros, D. Russowski & S.M. Grando* 81-86

Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. *S.O. Hübner, R. Weiblen, F.L. Tobias, N. Cancian, S.A. Botton, M. Oliveira & M. Zanini* 87-90

CONTENTS

Investigation of antibodies to Brucella ovis in sheep of the State of São Paulo. *Marcia Marinho & Luis Antonio Mathias* 45-48

Comparison of tripaflavina and dimetridazole in the treatment of bovine trichomoniasis. *V.L.T. Jesus, H.G. Guida, V.L.B. Andrade, N.M. Serra-Freire, A.A. Ramos & E.B.B. Pereira* 49-51

Streptomycin increases the adherence on oral epitelial cells of Bacteroides melaninogenicus involved in the periodontal lesions of "cara inchada"in cattle. *P.A. Kopp, I.S. Dutra, J. Döbereiner, M. Schmitt, B. Grassmann & H. Blobel* 53-57

Experimental poisoning by the seeds of Abrus precatorius (Leg. Papilionoideae) in sheep. *M.F. Brito, A.G. Armién & C.H. Tokarnia* 59-66

Epidemiological and clinical aspects of the epizootic botulism of cattle in the State of São Paulo. *J.A.N. Lisbôa, M.R.G. Kuchembuck, I.S. Dutra, R.C. Gonçalves, C.T. Almeida & I.R. Barros Filho* 67-74

Brucella ovis infection of sheep in Rio Grande do Sul, Brazil. *A. Magalhães Neto & C. Gil-Turnes* 75-79

Ultrastructural alterations of bone cells in the experimental Solanum malacoxylon poisoning of rabbits. *S.S. Barros, D. Russowski & S.M. Grando* 81-86

Evolution of passive immunity against bovine leukemia virus. *S.O. Hübner, R. Weiblen, F.L. Tobias, N. Cancian, S.A. Botton, M. Oliveira & M. Zanini* 87-90

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.

Copyright© 1981 Colégio Brasileiro de Patologia Animal

R. Lauro Müler 455, Botafogo, RJ 22290-160
Tel. (021) 541-2132, R. 116, fax (021) 295-7944

Filiada à ABEC - Associação Brasileira de Editores Científicos

Pesquisa veterinária brasileira = Brazilian journal of veterinary research. - v.1 - n.1 - 1981 -
Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Patologia Animal, 1981 -

v. trim. ISSN 0100-736X

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

CDD 636.089
CDU 619:616 (81) (05)

Publicidade: Neotécnica Editora Ltda, Rua Evaristo da Veiga 16, sala 601, Centro, 20031-040 Rio de Janeiro, RJ; tel. (021) 263-7561

XV PANVET - Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, Campo Grande, MS, Brasil, 21-25.10.1996

(Comissão Organizadora: Av. Afonso Pena 2386, Ed. Dolor de Andrade, 8º andar, sala 84, Campo Grande, MS 79002-074; tel (067) 724-7071, fax (067) 383-4371, Comitê Científico (067) 724-4877)

XIV International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases, Limassol, Chipre, March 23-28, 1997.
(Organized by: Veterinary Public Health Institute K. Polydorou, P.O. Box 284, Nicosia, Chipre)

8th SYMPOSIUM ISVEE - International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Institut Pasteur, Paris, July 8-11, 1997
(Congress Office: CONVERGENCES ISVEE 97, 120 avenue Gambetta, F-75020 Paris, France)

Pesq. Vet. Bras. 16(2/3):45-48, abr./set. 1996

PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *Brucella ovis* EM OVINOS DO ESTADO DE SÃO PAULO[1]

Marcia Marinho[2] e Luis Antonio Mathias[3]

ABSTRACT.- Marinho M. & Mathias L.A. 1996. [**Investigation of antibodies to Brucella ovis in sheep of the State of São Paulo.**] Pesquisa de anticorpos contra Brucella ovis em ovinos do Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira 16(2/3):45-48.* Depto Med. Veterinária Preventiva, FCAVJ-Unesp, Jaboticabal, SP 14870-000, Brazil.

Eight hundred and fifty sheep sera from 18 herds, located in 15 municipalities of the State of São Paulo, were examined by complement fixation test, indirect enzyme immunoassay and gel diffusion test for antibodies to *Brucella ovis*. The combination of the serological test results and the clinical and epidemiological data suggest that none of the examined animals was infected. The complement fixation and the gel diffusion tests showed good specificity, but the indirect enzyme immunoassay showed false positive results in nine of the sera.

INDEX TERMS: *Brucella ovis*, serological diagnosis.

SINOPSE.- Foram examinados soros sanguíneos de 850 ovinos, pertencentes a 18 rebanhos situados em 15 municípios do Estado de São Paulo. Esses soros foram submetidos à reação de fixação de complemento, ao teste imunoenzimático indireto e à prova de imunodifusão em gel de ágar para a pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis*. A pesquisa de anticorpos e os dados clínicos e epidemiológicos sugerem que nenhum dos animais que fizeram parte do estudo estava infectado por aquela bactéria. A reação de fixação de complemento e a prova de imunodifusão em gel de ágar revelaram boa especificidade, mas o teste imunoenzimático indireto apresentou resultados falso-positivos em nove soros examinados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Brucella ovis*, diagnóstico sorológico.

INTRODUÇÃO

A infecção ovina por *Brucella ovis* causa uma enfermidade também conhecida como epididimite dos carneiros. O reconhecimento dessa bactéria como o agente etiológico da infecção foi relatado inicialmente por Buddle & Boyes (1953), na Nova Zelândia. A partir de então, a epididimite dos carneiros tem sido constatada praticamente em todos os países do mundo onde a ovinocultura encontra lugar de destaque na exploração pecuária, com exceção da Grã-Bretanha (Spencer & Burgess 1984).

A presenca de ovinos com anticorpos contra *B. ovis* também tem sido observada em outros países da América Latina, como é o caso do México (Ramos Rodriguez 1986) e do Chile (Tamoyo et al. 1989, Rojas et al. 1990).

No Brasil, essa infecção já foi diagnosticada no Rio Grande do Sul, através de observações clínicas, nos anos 60 (Mies Filho 1964, Ramos et al. 1967), tendo sido confirmada por Blobel et al. (1972). A ocorrência da infecção em ovinos do Rio Grande do Sul também tem sido constatada através de testes sorológicos (Magalhães Neto et al. 1991). Entretanto, são raros os estudos sobre a ocorrência da infecção em outras regiões do Brasil, não havendo qualquer trabalho a respeito da situação dessa enfermidade no rebanho ovino do Estado de São Paulo.

O diagnóstico da infecção por *B. ovis* tem sido feito, predominantemente, através de testes sorológicos, sendo que outros autores recomendam que o histórico do rebanho e o quadro clínico também sejam levados em consideração ao se interpretar o resultado dos testes sorológicos.

Dentre as provas mais amplamente utilizadas no diagnóstico desta infecção, encontra-se a reação de fixação de complemento e o teste de imunodifusão em gel (Myers et

[1] Aceito para publicação em 28 de fevereiro de 1996.

[2] Médica Veterinária, aluna do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp-Campus de Jaboticabal, São Paulo.

[3] Depto Medicina Veterinária Preventiva, (FCAV), Unesp-Campus de Jaboticabal, Rodov. Carlos Tonanni Km 5, Jaboticabal, SP 14870-000.

al. 1972, Jones et al. 1975). Além destas, também tem adquirido bastante destaque o teste imunoenzimático indireto (Rahaley et al. 1983, Cho & Niilo 1987, West et al. 1993).

Diante da inexistência de dados a respeito, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a frequência de reações sorológicas contra *Brucella ovis*, em ovinos de rebanhos do Estado de São Paulo, através da reação de fixação de complemento, do teste imunoenzimático indireto e da prova de imunodifusão em gel de ágar.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra obtida

Foram colhidas 850 amostras de sangue de ovinos adultos de diversas raças, procedentes de 18 rebanhos situados em 15 municípios do Estado de São Paulo (Avaré, Bauru, Botucatu, Colômbia, Dobrada, Itaí, Jaboticabal, Jaú, Lavínia, Matão, Pontal, São Joaquim da Barra, São Manoel, Serra Azul e Severínia), no período de julho de 1992 a setembro de 1993, sendo 151 soros de animais machos e 699 de fêmeas.

Provas sorológicas

Preparação do antígeno. O antígeno de *B. ovis*, utilizado nas três provas sorológicas, foi preparado de acordo com as recomendacões de Alton et al. (1988). Foi empregada a amostra 63/290, obtida junto ao Central Veterinary Laboratory (UK), sendo cultivada em *Brucella* ágar (Merck S.A., Brasil) acrescido de 10% de soro de coelho. A massa bacteriana foi autoclavada a 120ºC por 20 minutos e o material centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos, sendo o sobrenadante usado como antígeno.

Para a padronização, era feita uma titulação em bloco, testando-se, através das três provas empregadas no trabalho, várias diluições do antígeno contra várias diluições do soro controle positivo.

O antígeno obtido era dividido em alíquotas e conservado a -20ºC até o momento do uso.

Preparação do soro hiperimune. Para a obtenção de um soro que pudesse ser empregado como controle positivo nos testes sorológicos, um carneiro adulto foi submetido a inoculação, por via intratesticular, com uma dose de 244 x 10^{10} UFC de *Brucella ovis*, em dose única.

Reação de fixação de complemento. Foi empregada a microtécnica, com incubação a quente nas duas fases da reação e uma dose de cinco unidades hemolíticas 50% de complemento, recomendada por Alton et al. (1988). Com o objetivo de inativar o complemento, os soros eram tratados a 58ºC, em banho-maria, durante 30 minutos.

O antígeno foi preparado conforme descrito acima, com a diferença de que era ainda submetido a diálise em tampão fosfato pH 7,3, a fim de evitar a eventual ocorrência de efeito anticomplementar.

Prova de imunodifusão em gel de ágar. Empregou-se a técnica preconizada por Alton et al. (1988), com algumas modificações. Na preparação do gel, utilizou-se ágar Noble (Laboratórios Difco) a 1%, dissolvido em tampão borato e NaCl a 5%, acrescido de azida sódica na proporção final de 1/10.000. A solução do gel era colocada em uma placa de Petri de plástico, na quantidade suficiente para cobrir toda a superfície da mesma. Após o endurecimento do meio, eram feitas as cavidades. Na cavidade central era colocado o antígeno e em duas das cavidades externas, situadas diametralmente opostas, era colocado o soro controle positivo. Nas outras quatro cavidades eram colocados os soros a serem testados. A incubação ocorria sob temperatura ambiente, em uma câmara úmida, sendo a leitura realizada após 24 e 48 horas de incubação.

Teste imunoenzimático indireto. O teste foi realizado, basicamente, conforme descrito por Jeggo & Rothauer (1989). Utilizou-se um conjugado comercial, constituído por IgG de coelho anti-IgG de ovino, conjugada com peroxidase (Dacopatts, Dinamarca). O substrato utilizado foi o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e como cromógeno utilizou-se a OPD (Ortofenilenodiamina, Sigma Chemical Company, USA). Para interromper a reação, após a ação da enzima sobre o substrato, empregou-se ácido cítrico 0,25 N. A leitura da densidade óptica era em um aparelho Titertek Uniskan, em comprimento de onda de 450 nm. Considerava-se como positivo o soro que apresentasse densidade ótica superior a duas vezes a média das densidades ópticas observadas no controle negativo.

Análise estatística. Os resultados das provas sorológicas foram comparados entre si através do teste de X^2.

RESULTADOS

Dos 850 soros de ovinos examinados, apenas dois apresentaram título, de 1/2, na reação de fixação de complemento, título este muito baixo para que os animais possam ser considerados como infectados por *B. ovis*. Estes dois soros eram oriundos do município de Jaboticabal. Outros sete soros, do município de São Joaquim da Barra, apresentaram atividade anticomplementar, o que impediu a determinação do título sorológico através da fixação de complemento (Quadro 1).

Os dados do Quadro 2 mostram que nove (1,96%) dos ovinos examinados apresentaram resultado positivo no teste imunoenzimático indireto. Estes resultados positivos foram observados nos municípios de Avaré (1), Itaí (1), Jaú (1), Lavínia (2) e São Manoel (4).

Nenhum dos 850 ovinos examinados apresentou resultado positivo ao teste de imunodifusão em gel de ágar para diagnóstico da infecção por *B. ovis* (Quadro 2).

Dos 151 carneiros abrangidos pelo estudo, nenhum apresentou sintomatologia compatível com a enfermidade.

Os nove soros com resultado positivo no teste imunoenzimático apresentaram resultado negativo na fixação de complemento e os dois soros com título 1/2 nesta prova apresentaram resultado negativo no teste imunoenzimático. O teste de X^2 revelou haver independência entre os resultados obtidos através destas duas provas (X^2 = 0,0202025, com 1 grau de liberdade).

Os resultados da reação de fixação de complemento foram bastante semelhantes aos da prova de imunodifusão em gel de ágar, principalmente quando se considera que o título de 1/2 observado na fixação de complemento não tem significado. Dessa forma, todos os soros apresentaram resultado negativo em ambos os testes.

Quadro 1. Número de soros de ovinos do Estado de São Paulo, 1993, distribuídos conforme o município de origem e os títulos de anticorpos obtidos contra *Brucella ovis* através da reação de complemento

Município	Nº de animais testados	Título de anticorpos					
		N	1/2	1/4	1/8	1/16	Ac[a]
Avaré	75	75	0	0	0	0	0
Bauru	40	40	0	0	0	0	0
Botucatu	31	31	0	0	0	0	0
Colômbia	32	32	0	0	0	0	0
Dobrada	34	34	0	0	0	0	0
Itaí	57	57	0	0	0	0	0
Jaboticabal	140	138	2	0	0	0	0
Jaú	61	61	0	0	0	0	0
Lavínia	72	72	0	0	0	0	0
Matão	24	24	0	0	0	0	0
Pontal	36	36	0	0	0	0	0
S. Joaquim da Barra	49	42	0	0	0	0	7
São Manoel	125	125	0	0	0	0	0
Serra Azul	61	61	0	0	0	0	0
Severínia	13	13	0	0	0	0	0
Total	850	841	2	0	0	0	7

[a]Ac = Atividade anticomplementar.

Quadro 2. Número de soros de ovinos do Estado de São Paulo, 1993, distribuídos conforme o município de origem e os resultados do teste imunoenzimático indireto (TIEI) e a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) obtidos contra antígeno de *Brucella ovis*

Município	Nº de soros testados	Nº de soros reagentes	
		TIEI	IDGA
Avaré	75	1	0
Bauru	40	0	0
Botucatu	31	0	0
Colômbia	32	0	0
Dobrada	34	0	0
Itaí	57	1	0
Jaboticabal	140	0	0
Jaú	61	1	0
Lavínia	72	2	0
Matão	24	0	0
Pontal	36	0	0
S. Joaquim da Barra	49	0	0
São Manoel	125	4	0
Serra Azul	61	0	0
Severínia	13	0	0
Total	850	9	0

Ao se comparar o teste imunoenzimático com o teste de imunodifusão, nota-se uma divergência de resultados, pois os nove soros com resultados positivos no primeiro teste apresentaram resultados negativos no segundo.

DISCUSSÃO

Embora o teste imunoenzimático indireto tenha revelado alguns resultados positivos, quando se utiliza a combinação entre os resultados dos três testes sorológicos e a manifestação de sintomatologia por parte dos animais, chega-se à conclusão que nenhum dos animais examinados estava infectado por *B. ovis*. Estes resultados diferem de pesquisas realizadas no Rio Grande do Sul (Magalhães Neto et al. 1991) e dos dados obtidos em outros países da América Latina, como, por exemplo, no México (Ramos Rodriguez 1986) e no Chile (Tamoyo et al. 1989, Rojas et al. 1990).

Os dados obtidos mostram que a epididimite dos carneiros não é um problema sanitário importante no rebanho do Estado de São Paulo e que, justamente por estar esta exploração em fase de crescimento, é importante que se adotem medidas sanitárias rigorosas, como por exemplo o exame clínico e sorológico de qualquer animal indroduzido nos plantéis, de modo a se evitar a introdução e a propagação da enfermidade nos rebanhos ovinos

No presente trabalho, observou-se que nenhum animal apresentou resultado positivo nas provas de fixação de imunodifusão em gel de ágar, embora nove animais tenham apresentado resultado positivo no teste imunoenzimático. Estes resultados são compatíveis com o fato de o teste imunoenzimático indireto apresentar uma capacidade de detecção superior à reação de fixação de complemento (Rahaley et al. 1983, Spencer & Burgess 1984, Worthington et al. 1984, 1985, Lee et al. 1985, Cho & Niilo 1987, West et al. 1993) e à prova de imunodifusão (Worthington et al. 1984). No entanto, quando se analisa a combinação dos resultados dos diversos testes, além da eventual manifestação de sintomas clínicos e histórico de sintomatologia nos rebanhos estudados, se deduz pela ausência de infecção entre os animais examinados. Obviamente não se pode desprezar a observação feita por vários autores de que os testes sorológicos, principalmente a reação de fixação de complemento quando utilizada na fase crônica, podem ser incapazes de detectar a infecção. Entretanto, contribuiu para que se chegasse à conclusão de que os resultados positivos revelados pelo teste imunoenzimático são, na verdade, resultados falso-positivos, o fato de o teste, da maneira como foi realizado e com o aparelho usado para a leitura da densidade óptica, ter proporcionado resultados irregulares e inconstantes, com vários dos soros aos quais foi atribuído um resultado positivo tendo apresentado densidades ópticas ora pouco abaixo ora pouco acima do limiar de positividade.

Esse desempenho do teste imunoenzimático indireto constituiu-se em um dado surpreendente, pois está em desacordo com a grande maioria dos trabalhos já publicados sobre o assunto, sendo esse teste recomendado por West & Bruce (1991) em adição à reação de fixação de complemento e ao exame clínico nos programas de erradicação da brucelose ovina. Também Walker et al. (1985) haviam observado que o diagnóstico pelo teste imunoenzimático associado à palpação do aparelho genital, com posterior eliminação dos infectados, propiciam bons resultados no controle da enfermidade.

O teste de imunodifusão em gel de ágar também é frequentemente empregado no diagnóstico sorológico da

brucelose causada por *B. ovis*, sendo considerada de mais fácil execução que a reação de fixação de complemento (Myers et al. 1972, Jones et al. 1975). No presente estudo, estes dois testes praticamente apresentaram uma concordância de 100%, embora essa comparação tenha sido prejudicada pela inexistência de animais reagentes.

Dos resultados deste trabalho se observou que a reação de fixação de complemento, em que pesem suas desvantagens, relacionadas principalmente com o fato de ser mais trabalhosa e exigir a disponibilidade constante de reagentes altamente lábeis, foi a prova que apresentou resultados mais regulares e mais constantes, que não deixavam margens de dúvida na interpretação e leitura do resultado final. Deve-se fazer uma ressalva a respeito de não se ter encontrado nenhum reagente, o que não permitiu a avaliação da sensibilidade do teste empregado em nossas condições. Apesar disto, e em conformidade com o procedimento estipulado por autores de países com elevada prevalência de infecção por *B. ovis* (West & Bruere 1983), pode-se recomendar o emprego da reação de fixação de complemento, associada a um rigoroso exame clínico do animal e a uma análise epidemiológica sobre o rebanho, para o diagnóstico sorológico daquela enfermidade.

REFERÊNCIAS

Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. & Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris. 190 p.

Blobel H., Fernandes J.C.T., Mies Filho A., Ramos A.A. & Trein E.J. 1972. Estudos sobre a etiologia da epididimite ovina no Rio Grande do Sul. Pesq. Agropec. Bras. 7:1-4.

Bundle M.B. & Boyes B.W. 1953. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. Aust. Vet. J. 29:145- 159.

Cho H.J. & Niilo L. 1987. Diagnostic sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Can. J. Vet. Res. 51:99-103.

Jeggo M.H. & Rothauer D. 1989. Elisa kit for the detection of antibodies against *Brucella abortus*. Atomic Energy Agency, Vienna. 25 p.

Jones L.M., Dubray G. & Marly J. 1975. Comparison of diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams. Ann. Rech Vét. 6:11-22.

Lee K., Cargill C. & Atkinson H. 1985. Evaluation of an enzyme linked-immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Aust. Vet. J. 62:91-93.

Magalhães Neto A., Dacrose O., Cruz F.W., Ferreira J., Martins S.R. & Gil-Turnes C. 1991. Prevalência de brucelose ovina em carneiros de 50 rebanhos do Rio Grande do Sul. 16º Congr. Bras. Microbiologia, Santos, 1991. Revta Microbiol. 22 (Supl.) 1:198. (Resumo)

Mies Filho, A. 1964. Epididimite ovina no Rio Grande do Sul. Anais III Conf. Soc. Vet. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 29-30.

Myers D.M., Jones L.M. & Varela-Diaz V.M. 1972. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. Appl. Microbiol. 23:894-902.

Rahaley R.S., Dennis S.M. & Smeltzer M.S. 1983. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for detecting *Brucella ovis* antibodies in sheep. Vet. Rec. 113:467-470.

Ramos A.A. , Mies Filho A., Schenck J.A.P., Vasconcelos L.D., Prado O.T.G., Fernandes J.C.T. & Blobel H. 1967. Epididymitis in rams. A clinical survey in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Pesq. Agropec. Bras. 1:211-213.

Ramos Rodriguez H. G. 1986. Determinación de anticuerpos contra *Brucella ovis* en suero de ovinos mediante fijación del complemento y precipitación en ágar. Veterinaria, Mexico, 17:344.

Rojas X., Alonso O., Rosenfeld C., Uribe C., Fernandes V. & Tadich N. 1990. Brucelosis ovina. Situación actual en explotaciones pequeñas de una comuna del sur de Chile. Arch. Med. Vet. 22:55-63.

Spencer T.L. & Burgess G.W. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antiboby in ram sera. Res. Vet. Sci. 36:194-198.

Tamoyo R., Valentin H. & Schoebitz R. 1989. Determinación de anticuerpos a *Brucella ovis* en ovinos de la X Región de Chile. Arch. Med. Vet. 21:22-28.

Walker R.L., Leamaster B.R., Stellflug J.N. & Biberstein E.L. 1985. Use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep: field trial. Am. J. Vet. Res. 46: 642- 646.

West D.M. & Bruere A.N. 1983. The *Brucella ovis* complement fixation. N. Z. Vet. J. 31:124-126.

West D.M. & Bruce R.A. 1991. Observations on the eradication of *Brucela ovis* infection from a ram flock. N. Z. Vet. J. 39:29-31.

West D.M., Stafford K.J., Alley M.R., Badcoe L.M., Hilbink F. &. Compton C.W.R. 1993. Serological and necropsy findings for rams infected with *Brucella ovis* which were not identified by the complement fixation test. N. Z. Vet. J. 41:82-86.

Worthington R.W., Weddell W. & Penrose M.E. 1984. A comparison of three serological tests for the diagnosis of *B. ovis* infection in rams. N. Z. Vet. J. 32:58-60.

Worthington R.W., Stevenson B.J. & Lisle G.W. 1985. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. N. Z. Vet. J. 33:84 -86.

Pesq. Vet. Bras. 16(2/3):49-51, abr./set. 1996

COMPARAÇÃO ENTRE O USO DE TRIPAFLAVINA E DIMETRIDAZOLE NO TRATAMENTO DA TRICOMONOSE BOVINA[1]

V.L.T. Jesus[2], H.G. Guida†[3], V.L.B. Andrade[3,4], N.M. Serra-Freire[5] A., A. Ramos[3] e E.B.B. Pereira[6]

ABSTRACT.- Jesus V.L.T., Guida H.G.†, Andrade V.L.B, Serra-Freire N.M., Ramos A.A & Pereira E.B.B. 1996. [**Comparison of tripaflavina and dimetridazole in the treatment of bovine trichomoniasis.**] Comparação entre o uso de tripaflavina e dimetridazole no tratamento da tricomonose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira 16(2/3):49-51.* Depto Parasitologia Animal, Inst. Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970, Brazil.

From 115 cattle herds 15 (13.04%) were infected by *Tritrichomonas foetus.* From 85 bulls 25 (29.07%) were positive for the infection: 12 bulls were treated with the topic use of 1% tripaflavina, and to the other 13 animals oral doses of 15g/100kg of 30% dimetridazole were administered. Post-treatment examination revealed that both groups of bulls were then free of infection. The results showed that the two treatments were equally efficient.

INDEX TERMS: Bovine trichomoniasis, tripaflavina, dimetridazole, treatment, *Tritrichomonas foetus.*

SINOPSE.- De 115 rebanhos bovinos, quinze (13,04%) estavam contaminados com *Tritrichomonas foetus.* Dos 85 reprodutores examinados pela técnica da microscopia direta do lavado prepucial, 25 (29,07%) estavam infectados: estes animais foram afastados da reprodução e submetidos ao tratamento. Um grupo foi medicado com tripaflavina a 1% (uso tópico), o outro com dimetridazole a 30%, na dose de 15g/100kg ("per os"). Conseguiu-se a recuperação de todos os touros tratados, comprovado pela realização de três lavados prepuciais consecutivos pós-tratamento e pelos resultados negativos e retorno destes reprodutores à monta natural. A duração entre o início do tratamento e a recuperação do touro infectado levou de 45 a 115 dias. Foi demonstrado pelo teste estatístico do qui-quadrado ao nível de 5%, haver diferença não significativa entre os dois métodos de tratamento.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Tricomonose bovina, tripaflavina, dimetridazole, tratamento, *Tritrichomonas foetus.*

INTRODUÇÃO

O tratamento da tricomonose preferentemente é realizado nos touros, por serem os veiculadores e hospedeiros do protozoário; nas fêmeas, apenas a parada da reprodução por 60 dias, provoca a eliminação da infecção (Levine 1973).

Para a tricomonose são recomendadas duas formas diferentes de tratamento, a tópica, na membrana prepucial com tripaflavina a 1% (Abelein 1941), e a oral com dimetridazole a 30% (McLoughlin 1963).

Segundo Abelein (1941), a infecção de touros é muito difícil de ser tratada com os agentes tricomonicidas; normalmente os tratamentos são demorados, tediosos e geralmente requerem muitas repetições, o que na maioria das vezes acaba induzindo ao sacrifício dos touros ou a castração. Os produtos usados mais rotineiramente são tripaflavina e acriflavina; destacou a maior eficiência da acriflavina, mas apontou a destruição de tecidos como uma desvantagem. Swangard (1938, 1939) empregou a tripaflavina a 0,5% no prepucio e na uretra conseguindo bons resultados. Abelein (1941) realizou idêntico tratamento só que com tripaflavina a 1% injetada na uretra, recuperando 80% dos touros infectados. Comparou a eficiência da pomada de tripaflavina solúvel em água com um pro-

[1] Aceito para publicação em 29 de fevereiro de 1996.

[2] EMGOPA, Caixa Postal 45, Goiania, GO 74001-970.

[3] Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Setor de Patologia da Reprodução, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970.

[4] Atualmente Embrapa/CNPAB, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970.

[5] Depto Parasitologia Animal, Inst. Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 47, Seropédica, RJ 23851-970.

[6] Depto Matemática, UFRRJ.

duto identificado com GPC, concluindo que este era melhor, porém não referiu a base química nem o nome comercial. McLoughlin (1963, 1965) testou o dimetridazole por via sistêmica administrado oralmente, na dose de 50 mg/kg, e conseguiu 100% de cura, mas ressaltou o aparecimento de inapetência em alguns touros tratados com aplicação oral; também assinalou desordens digestivas quando obteve 94,4% de eficácia no tratamento da tricomonose em touros, com dimetridazole 60 mg/kg. Villar et al. (1981) apontaram alguns fatores que induziam a resistência de *Tritrichomonas foetus* ao dimetridazole, entre os quais estavam a regurgitação do produto provocando a sub-dosagem e os tratamentos maciços repetidos sem controle profissional.

O presente trabalho objetiva avaliar comparativamente a eficiência da tripaflavina tópica e do dimetridazole oral, na recuperação dos reprodutores portadores de *T. foetus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Setor de Patologia da Reprodução, Embrapa-Itaguaí/RJ, durante os anos de 1987 a 1989. Foram visitadas 115 propriedades rurais, localizadas nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais com suspeita da ocorrência de tricomonose bovina. Nestas foram examinados 85 reprodutores que se encontravam em serviço de monta natural. O diagnóstico da tricomonose bovina foi realizado através da coleta do lavado prepucial, segundo a técnica de Mello (1953). Para a conservação do lavado prepucial e transporte do campo até o laboratório, foram adicionados 3g do meio Guida-Kupferberg para 60 ml de solução fisiológica a 0,85%, e mantidos em temperatura ambiente (Skirrow & Bondurant 1972).

No laboratório, decorridas no mínimo 48 horas da coleta do lavado prepucial este foi centifugado e examinado o sedimento, por microscopia direta, com aumento de 100x. A visualização de um protozoário por lâmina era o bastante para o reprodutor ser considerado positivo para a tricomonose e direcionada para o tratamento.

O tratamento dos 25 touros de diferentes raças, positivos para tricomonose, infectados naturalmente e com idade variando de 4 a 7 anos, foi programado com uso dos dois tricomonicidas comercializados no Brasil: tripaflavina a 1% (uso tópico, na membrana prepucial) e dimetridazole a 30% (via oral). Para avaliar a eficiência dos dois esquemas de tratamento, os touros foram divididos em dois grupos por aleatoriedade simples, ficando um com 12 e o outro com 13 animais.

Touros tratados com tripaflavina a 1% (Grupo 1)

Neste grupo foram trabalhados doze touros das seguintes raças: Holandês preto e branco, Fleckvieh, Charolês e Gir, todos com histórico clínico de problemas reprodutivos.

Para a realização do tratamento tópico da membrana prepucial e do pênis, conteve-se cada animal com auxílio de cordas; procedeu-se a assepsia da área prepucial, lavando com água e sabão, cortando os pêlos do prepúcio e enxugando a região com toalha de papel. Para exposição do pênis provocou-se bloqueio dos nervos pudendos internos com novocaína a 3%, seguindo a técnica de Larson (1953), ou promoveu-se o relaxamento do músculo retrator do pênis, com o uso de anestésico a base de acepromazina a 1% administrado pela via parenteral. O pênis exposto foi lavado com água oxigenada 10 volumes a 30%, enxuto com gaze esterilizada; em seguida passou-se a pomada tripaflavina 1% em veículo oleoso, cerca de 50 g/animal, em todo o prepúcio, através de fricções vigorosas durante 5 minutos. Ao término do tratamento, o touro retornava para sua baia, sem qualquer alteração no seu comportamento.

Touros tratados com dimetridazole a 30% (Grupo 2)

Este grupo de 13 touros, das raças Holandês preto e branco, Holandês vermelho e branco, Gir e Charolês, também com histórico de falhas na cobertura, receberam o tratamento pela via oral, com dimetridazole a 30%. Este medicamento por não ter boa palatabilidade, foi misturado a ração, na dose de 15g/100kg durante 5 dias consecutivos e, após 15 dias administrada a dose reforço, na mesma dosagem e período de aplicação.

Controle pós-tratamento dos dois grupos tratados

Os 25 touros tratados foram afastados da monta natural. Somente após três coletas consecutivas de lavados prepuciais, com intervalo de 15 dias, com resultados negativos para a tricomonose, os touros foram considerados livres de infecção e liberados para retorno ao serviço de monta natural. Caso continuasse o diagnóstico positivo para tricomonose, em um destes lavados, seria realizado um novo tratamento obedecendo a mesma metodologia.

Métodos estatísticos

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e ao teste do qui-quadrado com significância ao nível de 5%.

RESULTADOS

Durante os três anos de trabalho encontrou-se em 15 propriedades rurais (13,04%) a tricomonose no rebanho. Dos 85 touros em serviço de monta natural, 25 (29,07%) estavam parasitados por *Tritrichomonas foetus* (Quadros 1 e 2).

Os doze touros tratados com tripaflavina a 1% (uso tópico) foram recuperados para o serviço de monta natural, sendo: seis (50,0%) com um tratamento, quatro (33,33%) com dois tratamentos, e dois (16,67%) com três tratamentos.

Dos touros tratados com dimetridazole a 30%, foram recuperados doze touros sendo sete (53,85%) com dois tratamentos, cinco (38,46%) com três tratamentos, e um animal (7,69%) não se recuperou para o serviço de monta natural com este medicamento. Em face do acontecido o touro foi submetido ao tratamento com tripaflavina 1%, conseguindo-se a recuperação clínica da infecção, após dois tratamentos com este produto terapêutico.

Quadro 1. Número de propriedades visitadas em três anos para diagnóstico da tricomonose bovina, através do exame microscópico do lavado prepucial de touro

Anos	Propriedades		% de tricomonose
	Visitadas	Com tricomonose	
1987	37	05	13,51
1988	41	07	17,07
1989	37	03	8,10
Total	115	15	13,04

Quadro 2. Resultados do exame microscópico do lavado prepucial dos reprodutores bovinos, dos rebanhos visitados durante três anos

Anos	Reprodutores		
	Examinados	Com tricomonose	
	nº	nº	%
1987	25	11	44,00
1988	37	10	27,02
1989	23	04	17,39
Total	85	25	29,07

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Com o índice de prevalência de 29,07%, de touros portadores de *Tritrichomonas foetus* dentre rebanhos com problema reprodutivos, fica evidente a importância de controle da tricomonose para o implemento da pecuária bovina, mormente para a recuperação de touros de alto valor genético, para o serviço de monta natural.

Quando comparadas as duas práticas terapêuticas pode-se observar que no grupo de touros tratados com tripaflavina 1%, não houve formação da membrana fibrinótica na mucosa prepucial, uma causa de aderências como foi relatado por Swangard (1938) e Lang (1956), mesmo realizando-se massagens vigorosas, quando da aplicação da pomada.

Interpretando-se os resultados, com base na constatação da necessidade de realizar mais de um tratamento para conseguir a recuperação de alguns touros, verificou-se que isto ocorreu principalmente devido a não completa cooperação dos proprietários que não afastaram de imediato do serviço de monta natural todos os touros; quando foram seguidas corretamente as recomendações preconizadas para o rebanho, sempre foi obtido um bom índice de recuperação do touro, no prazo mãximo de 45 a 50 dias.

A aplicação da pomada de tripaflavina foi restrita a membrana prepucial e pênis, por ser o local da eleição do protozoário no hospedeiro (Swangard 1938, 1939, Hammond & Bartlet 1943, Clarck et al. 1974), contrariando a indicação de Mello (1954), que recomendou a aplicação do medicamento na uretra.

No grupo de touros tratados pela via sistêmica, o derivado do imidazole escolhido foi o dimetridazole (McLoughlin 1965), por ser mais eficiente e menos prejudicial à espermatogenese do touro submetido ao tratamento.

No tratamento "per os", sempre foi aplicado a dose reforço, após 15 dias do término do primeiro tratamento, com intuito de manter maior concentração e por mais tempo a presença do medicamento na circulação sanguínea. Não foi observado nenhum caso de regurgitação, timpanismo ou diarréia tal como o mencionado, por Siqueira et al. (1973).

Com respeito ao retorno do touro tratado ao serviço de monta natural, sempre foi realizado simultaneamente o levantamento sanitário das fêmeas, para diminuir os riscos da recontaminação do touro tratado.

Embora o tratamento tópico seja considerado um método laborioso (Hammond 1953, Siqueira et al. 1973, Soulsby 1975, Skirrow & Bondurant 1988), por requerer do executor do tratamento, maior conhecimento técnico, o dimetridazole pode ser administrado por leigos, sem a necessidade da supervisão diária do técnico. Houve diferença não significativa na eficiência dos dois métodos, mas há o risco de subdosagens no tratamento oral e da realização de tratamentos incompletos que resultam na resistência do protozoário ao medicamento (McLoughlin 1965, Villar et al. 1981).

Pelos resultados conseguidos com touros tratados com tripaflavina e dimetridazole, ficou constatado que os dois métodos são eficazes para o tratamento da tricomonose bovina; a escolha do tratamento (quanto ao medicamento e via) depende das condições de manejo do rebanho infectado.

REFERÊNCIAS

Abelein R. 1941. Zur Krisis in der Beurteilung der Trichomonadenseuche des Rindes. Tierärztl Wschr. 5:261-265.

Clarck B.L., Parsonson I.M. & Dufty J.H. 1974. Experimental infection of bulls with *Tritrichomonas foetus*. Aust. Vet. J. 50:189-191.

Hammond D.M. & Bartlett D.E. 1943. The distribuition of *Tritrichomonas foetus* in the preputial cavity of infected bulls. Am. J. Vet. Res. 4:143-149.

Hammond D.M. 1953. The efficacy of Bovoflavin salve in the experimental treatment of trichomoniasis in bulls. Cornell Vet. 43(1):121-127.

Lang J.A. 1956. *Trichomonas foetus* infection of cattle. FAO Agric. Stud. 33:1-39.

Larson L.L 1953. The internal pudendal (pudic) nerve block for anesthesis of the penis and relaxation of the retractor penis muscle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 7:18-27.

Levine N.D. 1973. Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. 2nd ed. Burgess Publ. Comp., Minneapolis, Minnesota, IX+406 p.

McLoughlin D.K. 1963. A systemic treatment for bovine trichomoniasis. J.Parasitol. 49:959.

McLoughlin D.K. 1965. Dimetridazole. A systemic treatment for bovine veneral trichomoniasis. 1. Oral administration. J. Parasitol. 51(5):835-836.

Mello M.R. 1953. Meio prático para diagnóstico da tricomoniase bovina. Bolm Soc. Bras. Med. Vet. 21:11-16.

Mello M.R. 1954. Sobre o tratamento da tricomonose em touros. Veterinária, Rio de J., 8(2): 55-63.

Siqueira P.A., Mosse G.& Portugal M.A.S.C. 1973. Traitment de la trichomonose des bovins par le Dimetridazole. Cah. Med. Vét. 42:176-179.

Skirrow S. & Bondurant R.H. 1988. Bovine trichomoniasis. Vet. Bull. 58(8):571-603.

Skirrow S. & Bondurant R.H. 1992. Microbial agents associated with bovine genital tract. Vet. Bull. 62(8): 768-775.

Soulsby E.J.L. 1975. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals (Mönning). 6th ed. Woverley Press, London. 824 p.

Swangard W.M. 1938. Control of trichomoniasis in cattle. Vet. J. 94(6):446-453.

Swangard W.M. 1939. Trichomoniasis in cattle: biological studies on a system of control. J. Am. Vet. Med. Assoc. 95:146-151.

Villar J.A., Palladino M. & Campero C. 1981. Tricomoniasis bovina: resistência a tratamentos, um problema actual. Gaceta Vet. 43(365):892-893.

Pesq. Vet. Bras. 16(2/3):53-57,abr./set. 1996

ESTREPTOMICINA AUMENTA A ADERÊNCIA EM CÉLULAS EPITELIAIS DE *Bacteroides melaninogenicus* ASSOCIADO ÀS LESÕES PERIDENTÁRIAS DA "CARA INCHADA" DOS BOVINOS[1]

Peter A. Kopp[2], Iveraldo S. Dutra[3], Jürgen Döbereiner[4], Martin Schmitt[2], Barbara Grassmann[2] e Hans Blobel[2]

ABSTRACT.- Kopp P.A., Dutra I.S., Döbereiner J., Schmitt M., Grassmann B. & Blobel H. 1996. [**Streptomycin increases the adherence on oral epitelial cells of Bacteroides melaninogenicus involved in the periodontal lesions of "cara inchada" in cattle.**] Estreptomicina aumenta a aderência em células epiteliais de Bacteroides melaninogenicus associado às lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira 16(2/3):53-57.* Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970, Brazil.

"Cara inchada" of cattle (CI) is a periodontitis which occurs in calves in several regions of Brazil. Its progressive lesions, caused mainly by *Bacteroides melaninogenicus* and *Actinomyces pyogenes,* could lead to loss of teeth, malnutrition and possibly death of affected animals. For further analysis of the pathogenesis of this disease the influence of streptomycin on the adherence of the causative bacteria to oral epithelial cells of cattle was determined. Production of streptomycin by soil bacteria (Actinomycetes) in Brazil had been suggested by several authors. In our studies, streptomycin in subinibitory concentrations increased tenfold the rate of adherence with *B. melaninogenicus* (from 0.4 to 4.0 bacteria per bovine epithelial cell). On the contrary, streptomycin did not influence significantly the adherence of *A. pyogenes* nor streptococci of the *viridans* group. Thus, streptomycin could be a contributing factor to the development of the periodontal infections with *B. melaninogenicus.*

INDEX TERMS: Streptomycin, adherence, oral epithelial cell, *Bacteroides melaninogenicus,* periodontitis, cattle, "cara inchada".

SINOPSE.- A "cara inchada" dos bovinos (CI) é uma periodontite que afeta bezerros em várias regiões do Brasil. Constitui-se por lesões progressivas, causadas principalmente por *Bacteroides melaninogenicus* e *Actinomyces pyogenes*, podendo evoluir para a perda dos dentes, emaciação e possivelmente morte dos animais afetados. Para prosseguimento dos estudos sobre a patogênese da doença foi determinada no presente trabalho a influência da estreptomicina sobre a aderência, em células epiteliais oral de bovinos, de duas das principais bactérias associadas à CI. Produção de estreptomicina por bactérias do solo (Actinomicetos) no Brasil tem sido sugerido por Baldani et al. (1982). Em concentrações subinibitórias a estreptomicina aumentou em dez vezes a taxa de aderência de *B. melaninogenicus* (de 0,4 para 4,0 bactérias por célula epitelial bovina). Por outro lado, a estreptomicina não influenciou significativamente a aderência de *A. pyogenes* ou de estreptococos do grupo *viridans*. Com base nesses resultados pode-se depreender que a estreptomicina seja um fator que contribua para o desenvolvimento da infecção peridentária característica da CI.

[1] Aceito para publicação em 5 de março de 1996.

Trabalho realizado com o auxílio da FAPESP/DAAD (Proc. nº 95/0169-5).

[2] Institut für Bakteriologie und Immunologie, Justus Liebig-Universität, Frankfurter Str. 107, D-35392 Giessen, Alemanha.

[3] DAPSA, Universidade Estadual Paulista, Cx. Postal 533, Araçatuba, SP 16015-050; bolsista CNPq (305967/85-1).

[4] Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, RJ 23851-970; bolsista CNPq (305294/88-1).

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Estreptomicina, aderência, célula epitelial oral, *Bacteroides melaninogenicus,* periodontite, bovinos, "cara inchada".

INTRODUÇÃO

No estágio atual do conhecimento sobre a "cara inchada" dos bovinos (CI) no Brasil não existe qualquer evidência de que suspeitas de tratar-se de doença de nutrição sejam verdadeiras. Desta forma, não podiam ser comprovadas as afirmações de que a CI seja uma enfermidade primária do esqueleto, determinada por fator nutricional, como ocorre com a osteodistrofia fibrosa dos equinos (Rosa & Döbereiner 1994). Mas desde o início do estudo da CI suspeita-se que a periodontite deve ser desencadeada por um fator determinante existente na alimentação (Döbereiner et al. 1974, 1975, 1976, Rosa et al.1976).

É cada vez mais evidente o papel que bactérias têm no aparecimento e desenvolvimento dessa periodontite, em especial *Bacteroides melaninogenicus* associado a *Actinomyces pyogenes* (Blobel et al. 1984, 1987), com a produção de considerável número de enzimas e toxinas capazes de provocar em danos tissulares (Dutra et al. 1986); não há indicação de alteração primária do colágeno peridentário (Seifert et al. 1983). Uma importante questão nesse contexto é como estes microrganismos colonizam o espaço sublingual e desencadeam uma periodondite purulenta com periostite ossificante secundária, considerando-se ainda que foram isolados em pequeno número de bovinos sadios (Blobel et al. 1984).

Por isso, Schmitt et al. (1996) investigaram as possíveis correlações entre a imunidade celular de bovinos e a CI. Verificaram que a aderência de *B. melaninogenicus* e a sua fagocitose por granulócitos polimorfonucleares eram diminuídas em bezerros com CI, porém a quimiotaxia não era afetada.

Numerosos estudos anteriores indicaram que importante fator desencadeante para a infecção peridentária deve estar relacionado com a modificação da microbiota do solo em virtude do desmatamento de florestas virgens e da vegetação natural do cerrado para a sua transformação em pastagens ou ainda posteriores reformas dessas (Döbereiner 1990, Dutra et al. 1993). Nesse contexto são de interesse as indicações indiretas obtidas por Baldani et al. (1982), de que em tais solos ocorre um significativo aumento do número de Acinomicetos produtores de estreptomicina.

O objetivo deste trabalho foi verificar o comportamento de bactérias (particularmente *Bacteroides melaninogenicus, Actinomyces pyogenes* e estreptococos do grupo *viridans*), quando tratadas com estreptomicina, frente à sua capacidade de aderência em células epiteliais oral de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias

As culturas bacterianas utilizadas no estudo foram isoladas de lesões peridentárias de bezerros com CI e mantidas na coleção do Instituto de Bacteriologia e Imunologia, da Universidade de Giessen, Alemanha, de onde foi obtida também a amostra de *Streptococcus* do grupo *viridans*. Em razão da complexidade taxonômica, a amostra de *Bacteroides* pigmentado de negro utilizada foi denominada *Bacteroides melaninogenicus* (Blobel et al. 1984).

Determinação da concentração subinibitória de estreptomicina

A determinação da concentração subinibitória foi realizada segundo o método de diluição (Sutter 1985, Jones et al. 1985), com a verificação final do número de bactérias através de fotometria (Benchetrit et al. 1981). Concentrações crescentes (0,5-25/µg/ml) de estreptomicina (Sigma, Deisenhofen, Alemanha) foram adicionadas em meios de cultura líquidos (40 ml de THB para *A. pyogenes* e estreptococos e 40 ml de BHI, modificado segundo Eley et al. (1984), para *Bacteroides*). Os meios de cultura contendo o antibiótico foram inoculados com 2 ml de uma pré-cultura pura e densa dos respectivos microrganismos e finalmente incubados a 37°C de acordo com as respectivas características de crescimento (*A. pyogenes* e estreptococos 24 h, *Bacteroides* 5 dias em anaerobiose). A determinação da concentração subinibitória (inibição de 50% do crescimento) foi realizada em fotômetro (540nm). Como standard (= 0% de crescimento) foram utilizadas as mesmas culturas com estreptomicina e a pré-cultura, no entanto mantidas a 4°C; culturas bacterianas sem antibiótico e incubadas de acordo com os respectivos períodos de cultivo foram consideradas como 100% de crescimento. Para a utilização na pesquisa sobre aderência foram empregadas as culturas que demonstraram cerca de 50% de inibição do crescimento (concentração inibitória de 50%, IC_{50}). A concentração subinibitória de cada espécie de bactéria foi aferida através de 6 repetições idênticas. Os resultados obtidos foram os seguintes: 2µg/ml e 15µg/ml de estreptomicina para a $I0_{50}$ de *A. pyogenes* e *Bacteroides*, respectivamente (Fig. 1). Os estreptococos do grupo *viridans* foram resistentes à estreptomicina; desta maneira foram tratados previamente com 2 µg/ml do antibiótico para excluir modificações na superfície das bactérias. As diferentes espécies de bactérias empregadas, tanto as não tratadas com estreptomicina como as tratadas com a concentração subinibitória foram cultivadas, com o auxílio de um fotômetro aferidas para 10% de transmissão (~10^9 bactérias) e liofilizadas.

Células epiteliais

As células epiteliais de bovinos de diferentes idades e da raça zebú foram obtidas da mucosa da gengiva lingual maxilar, em áreas próximas dos Pd_2-Pd_3 (filogeneticamente, Pd_3-Pd_4) e eventualmente M_1-M_3, com o auxílio de uma espátula de madeira. As células foram várias vezes sistematicamente lavadas em PBS (pH 7,5) a 1.200 xg, aferidas para uma concentração de 10^5/ml de PBS com o auxílio da câmara de Thoma, e mantidas a 4°C até a sua utilização.

Marcação das bactérias

As bactérias liofolizadas foram ressuspendidas em água destilada e diluídas 1:10 em PBS. Para cada 1 ml da suspenção foi adicionado 1mg de FICT (Isotiocianato de fluoresceína, Sigma), que foram incubados a 37°C em banho-maria com agitação e finalmente lavados quantas vezes necessárias a 10.000 xg em PBS até a clarificação do sobrenadante. O pelete final foi ressuspendido em 1 ml de PBS.

Teste de aderência

Bactérias marcads com FITC (0,5ml) foram incubadas por 60 min a 37°C em banho-maria sob agitação, juntamente com 0,5 ml de células epiteliais. Quando empregadas combinações de duas espécies diferentes de bactérias, as células epiteliais (0,5 ml) fo-

ram previamente incubadas por 30 min a 37°C com as bactérias não marcadas. Logo após, eram acrescentados 0,5 ml de bactérias marcadas e a mistura total então incubada a 37°C por 60 min. A separação das bactérias não ligadas das aderidas foi realizada através de centrifugação (8.000 xg por 2 min) por gradiente, com a utilização de Percoll (Sigma). As células epiteliais na camada de separacão foram pipetadas, lavadas em PBS (4x a 1.200xg) e duas gotas do preparado levadas em lâmina para leitura em microscópio de fluorescência (Valentin-Weigand et al. 1987).

RESULTADOS

Os resultados da influência da estreptomicina sobre a aderência em células epiteliais de bactérias associadas à CI são apresentados no Quadro 1. Desta forma, a estreptomicina não apresentou clara influência sobre aderência de *A. pyogenes*. O mesmo não ocorreu com *Bacteroides*; após o tratamento prévio com 15 µg/ml de estreptomicina houve um aumento significativo da aderência nas células epiteliais (4,0/0,4) (Fig.2). A diminuição da aderência dos estreptococos do grupo *viridans* após o tratamento prévio com o antibiótico deveu-se à forte aglomeração dos mesmos.

Quadro 1. Ensaio da aderência com as bactérias associadas à "cara inchada", assim como com estreptococos do grupo *viridans*, tratados previamente e não tratados com estreptomicina

Preparado	Bactéria aderida/célula epitelial[a]
A. pyogenes (sem estreptomicina)	4,1
A. pyogenes (com estreptomicina)	4,8
Bacteroides sp. (sem estreptomicina)	0,4
Bacteroides sp. (com estreptomicina)	4,0
Estreptococos (sem estreptomicina)	4,1
Estreptococos (com estreptomicina)	1,8

[a] Os números são valores médios calculados em 6 preparados idênticos, cada um com 50 células epiteliais contadas.

Quadro 2. Combinações na pesquisa sobre aderência, realizadas com as diferentes bactérias associadas à "cara inchada" e com estreptococos do grupo *viridans*[a]

Preparado	Bactéria aderida/célula epitelial[b]
Estreptococos (sem estreptomicina) *A. pyogenes* (sem estreptomicina)	2,7
Estreptococos (com estreptomicina) *A. pyogenes* (sem estreptomicina)	2,7
Estreptococos (sem estreptomicina) *A. pyogenes* (com estreptomicina)	1,5
Estreptococos (com estreptomicina) *A. pyogenes* (com estreptomicina)	2,7
Bacteroides sp. (sem estreptomicina) *A. pyogenes* (sem estreptomicina)	3,1
Bacteroides sp. (com estreptomicina) *A. pyogenes* (sem estreptomicina)	2,4
Bacteroides sp. (sem estreptomicina) *A. pyogenes* (com estreptomicina)	4,0
Bacteroides sp. (com estreptomicina) *A. pyogenes* (com estreptomicina)	3,1

[a] Nestes ensaios somente foram marcadas e contadas as bactérias (no caso, *A. pyogenes*) adicionadas no segundo passo.

[b] Os números são valores médios calculados em 6 preparados idênticos, cada um com 50 células epiteliais contadas.

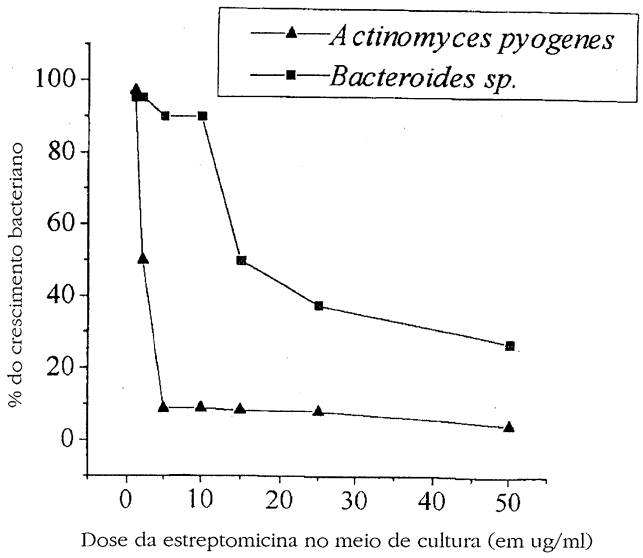
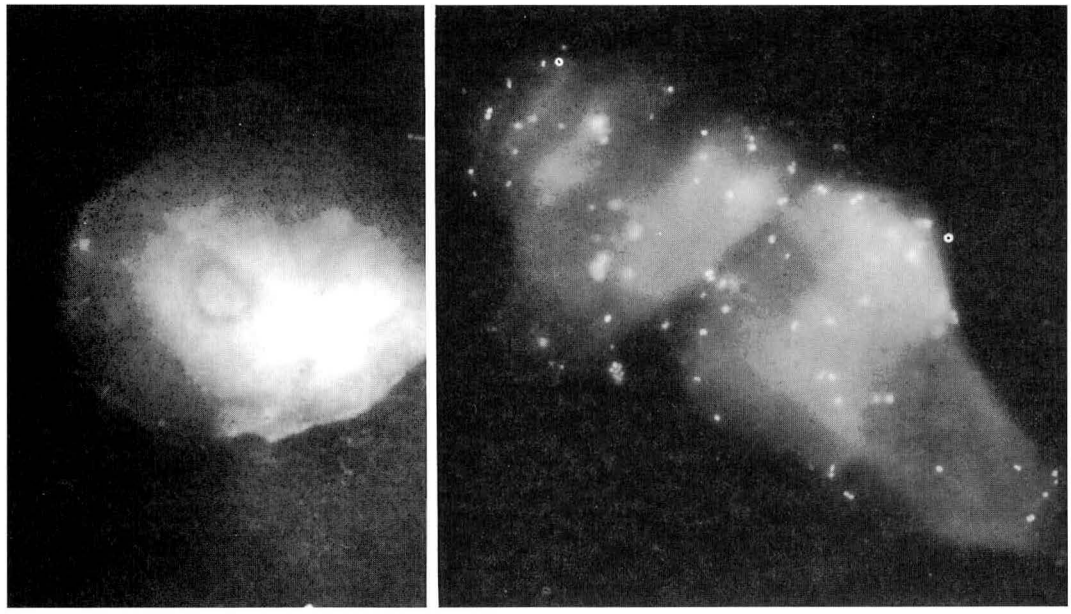


Fig. 1. Inibição do crescimento de *A. pyogenes* e *Bacteroides melaninogenicus* após a adição de estreptomicina, na dependência da concentração.

Nos ensaios com diferentes combinações os resultados foram bastante adversos (Quadro 2). Após a incubação prévia com *Bacteroides* e finalmente com *A. pyogenes*, ocorreram diferentes níveis de aderência de *Bacteroides* tratados com estreptomicina. Assim, ocorreu uma diminuição da aderência de *A. pyogenes* nas células epiteliais após a incubação prévia com *Bacteroides* tratados (2,4/3,1 - 3,1/4,0). Tão logo *Bacteroides* ocupam as células epiteliais, aparentemente estas não estão mais em condições de se ligarem a *A. pyogenes*, como nas células livres. Eventualmente ocorre uma concorrência nos locais de ligação na superfície celular. De qualquer forma comprova-se, de uma maneira indireta, a capacidade de ligação de *Bacteroides* tratados com estreptomicina. A combinação de estreptococos do grupo *viridans* e *A. pyogenes* demonstra que *A. pyogenes* neste ensaio não se liga mais que os cocos Gram-positivos na superfície celular; pelo contrário, observa-se uma ligeira diminuição da aderência.

Em razão dos resultados inéditos com *Bacteroides* não tratados e tratados (IC_{50}) nos ensaios de aderência sobre as células epiteliais (0,4/4,0), foi realizada a relação dose-dependência de estreptomicina no incremento da aderência do mesmo (Fig. 3). Os resultados da dependência da concentração de estreptomicina sobre a aderência de *Bacteroides* em células epiteliais demostraram que já em pequenas concentrações do antibiótico, abaixo dos µg/ml empregados na pesquisa preliminar, ocorreram influências positivas.



A B

Fig 2. Resultado de experimento de aderência de *Bacteroides melaninogenicus*, previamente tratados com doses subinibitórias de estreptomicina, a células epiteliais da mucosa da gengiva maxilar lingual de bovinos: (A) ausência da aderência de *B. melaninogenicus* não tratados com estreptomicina, e (B) nítida aderência de *B. melaninogenicus* tratados com estreptomicina, às células epiteliais. Marcação com isocianato de fluoresceína, obj. 100.

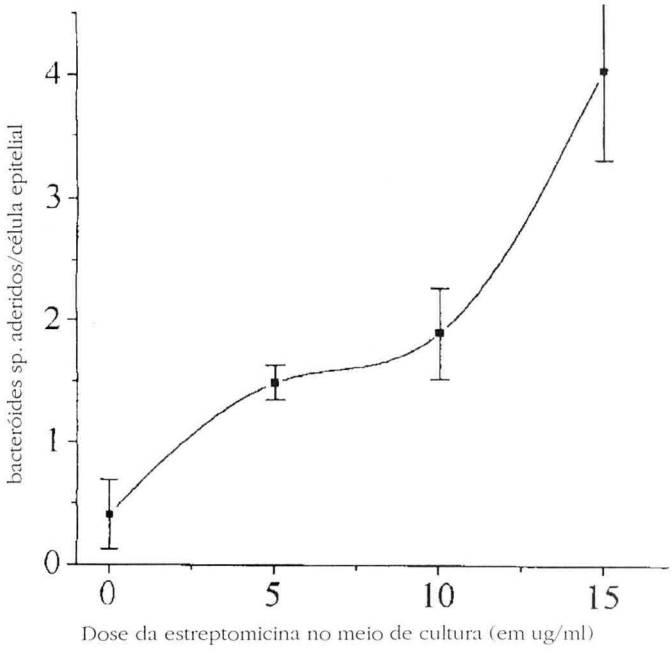


Fig. 3. Aumento da aderêrencia após adição de estreptomicina no meio de cultura. Os valores são resultados de 6 repetições idênticas.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a estreptomicina possui atividade influenciando positivamente a aderêrencia de *Bacteroides* pigmentados de negro. possivelmente este fenômeno tenha relação com a CI. Observa-se um paralelo entre um aumento do número de Actinomicetos produtores de estreptomicina em solos recém-cultivados de floresta ou cerrado virgens e a prevalência da CI. Nesta linha de raciocínio, os *Bacteroides*, sob a influência da estreptomicina, teriam melhores condições de aderirem a células epiteliais da mucosa oral. Em conjunto com *A. pyogenes* teriam então condições de provocarem danos tissulares diretos e indiretos na gengiva e no osso alveolar.

Nesse contexto, poderia ser de interesse também a ocorrência de CI em bezerros com idade de 2 a 3 meses, descrita por Döbereiner et al. (1974, 1987, 1990), onde o possível "fator desencadeante" estaria também no leite das mães. Assim, vacas que não são mais susceptíveis à CI, por ter completada a dentição, estariam ingerindo estreptomicina através da alimentação e eliminando-a pelo leite. Através da ingestão de leite contendo estreptomicina e sua influência positiva sobre a aderência de *Bacteroides*, poderia então ocorrer o desencadeamento da periodontite da CI nos bezerros.

REFERÊNCIAS

Baldani J.L., Baldani V.L.D., Xavier D.F., Body R.M. & Döbereiner Joh. 1982. Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. Revta Microbiol., S.Paulo, 13(3):250-263.

Benchetrit L.C., Avelino C.C. & Oliveira C.M. 1981. Effect of subminimal concentrations of penicillin on hyaluronidase production by group A streptococci. Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig.A 251:152-156.

Blobel H., Döbereiner J., Lima F.G.F. & Rosa I.V. 1984. Bacterial isolations from "cara inchada"-lesions of cattle. Pesq. Vet. Bras. 4(2):73-77.

Blobel H., Döbereiner J., Rosa I.V., Lima F.G.F. & Dutra I.S. 1987. Bakteriologische Untersuchungen an der "cara inchada", einer periodontalen Erkrankung bei Rindern in Brasilien. Tierärztl. Umschau 42:152-157.

Döbereiner J. 1990. Zur Ätiologie der "cara inchada", einer periodontalen Erkrankung der Jungrinder in Brasilien [Towards the etiology of "cara inchada", a periodontal disease of young cattle in Brazil]. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 97(11):482-490.

Döbereiner J., Inada J.T. & Tokarnia C.H. 1974. "Cara inchada", doença peridentária em bovinos. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet. 9:63-85.

Döbereiner J., Chaves J.A., Rosa I.V. & Houser R.H. 1975. Efeito da transferência de bovinos com "cara inchada" (doença peridentária) para pastos de região indene. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet. 10:99-103.

Döbereiner J., Rosa I.V. & Lazzari A.A. 1976. "Cara inchada" (doença peridentária) em bezerros mantidos em pastos de *Panicum maximum*. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet. 11:43-47.

Döbereiner J., Rosa I.V. & Lazzari A.A. 1987. Efeito do leite materno sobre as lesões peridentárias da "cara inchada" em bezerros. Pesq. Vet. Bras. 7:97-99.

Dutra I.S,. Kanoe M. & Blobel H. 1986. Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. Pesq. Vet. Bras. 6:59-63.

Dutra I.S., Matsumoto T. & Döbereiner J. 1993. Surtos de periodontite em bezerros ("cara inchada") associados ao manejo do solo, Pesq. Vet. Bras. 13(1/2):1-4.

Eley A.D., Greenwood D. & O'Grady F.1984. Comparative growth of Bacteroides species in various anaerobic culture media. J. Med. Microbiol. 19:195-201.

Jones R.N., Barry A.L., Gavan T.L. & Washington II J.A. 1985. Susceptibility tests: Microdilution and macrodilution broth procedures, p. 972-977. In: Lenette E.H., Balows A., Hauser Jr. W.J. & Shadomy H.J. (ed) Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. ASM Press, Washington, D.C. 1149 p.

Rosa I.V. & Döbereiner J. 1994. "Cara inchada" dos bovinos e deficiências minerais. Pesq. Vet. Bras. 14(1):43-48.

Rosa I.V., Carvalho J.C., Houser R.H. & Döbereiner J. 1976. Influência de ração balanceada sobre a "cara inchada" (doença peridentária) de bezerros. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet. 11:59-63.

Schmitt M., Dutra I.S., Döbereiner J., Kopp P.A. & Blobel H. 1996. "Cara inchada" and cellular immunity in cattle. Pesq. Vet. Bras. 16(1):1-3.

Seifert K., Walter P., Döbereiner J. & Rüsse I. 1983. Histological investigations of "cara inchada" in cattle. Pesq. Vet. Bras. 3(2):67-70.

Sutter V.L. 1985. Susceptibility testing of anaerobes, p. 988-990. In: Lenette E. H., Balows A., Hauser Jr. W.J. & Shadomy H.J. (ed.) Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. ASM Press, Washington, D.C. 1149 p.

Valentin-Weigand P., Chhatwal G.S. & Blobel H. 1987. A simple method for quantitative determination of bacterial adherence to human and animal epithelial cells. Microbiol. Immunol. 31(10):1017-1023.

Pesq. Vet. Bras. 16(2/3):59-66, abr./set. 1996

INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL PELAS SEMENTES DE *Abrus precatorius* (LEG. PAPILIONOIDEAE) EM OVINOS[1]

Marilene de Farias Brito[2], Anibal Guillermo Armién[3] e Carlos Hubinger Tokarnia[4]

ABSTRACT.- Brito M.F., Armién A.G. & Tokarnia C.H. 1996. [**Experimental poisoning by the seeds of Abrus precatorius (Leg. Papilionoideae) in sheep.**] Intoxicação experimental pelas sementes de Abrus precatorius (Leg. Papilionoideae) em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira 16(2/3):59-66.* Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970, Brazil.

The oral administration of the whole or finely ground seeds of *Abrus precatorius* (Leg. Papilionoideae), caused severe gastroenteritis in sheep. The lethal dose was 7.5 and 1.25 g/kg of respectively the whole and finely ground seeds. In the experiments with the whole seeds and lethal outcome, first symptoms were observed between 15 and 30 hours after administration, and the course of the poisoning varied from 35 to 41 hours; the period between administration of the seeds and death varied from 51 to 71 hours. The dose of 5 g/kg caused only slight poisoning and the animals were recovered between 6 and 8 hours after administration of the seeds.

In the experiments with the finely ground seeds and lethal outcome first symptoms were observed between 6 and 21 hours after administration, the course of poisoning was from 13 to 14 hours and the period between administration and death varied from 21 to 33 hours. The doses of 0.937, 0.625 and 0.3125 g/kg caused respectively severe, moderate and slight poisoning with recovery respectively in 7, 4, and 3 days after administration of the seeds.

The clinical-pathological picture was the same wether the animals received the whole or finely ground seeds. The main symptoms were colic and foetid diarrhea, with mucus and fibrine (pseudomembranes). Those animals which had received the larger doses, defecated frequently, in form of a jet of liquid feces. The main post-mortem findings were observed in the digestive tract, from abomasum to rectum; its wall had congestion, hemorrhages and oedema; fibrine covered the mucosa or was present in the intestinal contents, which were liquid in the small intestine and mucous in the large intestine. The mesenteric lymphnodes were swollen. The main histopathological findings concerned the digestive tract, especially the abomasum, but also from duodenum to the rectum, and were necrosis/hemorraghes of the mucosa, congestion and oedema of the submucosa and serosa.

INDEX TERMS: Poisonous plants, experimental plant poisoning, *Abrus precatorius*, Leguminosae Papilionoideae, pathology, sheep.

SINOPSE.- A administração por via oral das sementes de *Abrus precatorius,* cipó da família Leguminosae Papilionoideae, com os nomes populares de "tento", "olho-de-cabra", "olho-de-pombo" e "jiquiriti", inteiras ou moídas, causou quadro de intoxicação caracterizado por grave gastrenterite em ovinos. Para as sementes inteiras a dose letal foi 7,5 g/kg, para as sementes moídas 1,25 g/kg. Nos experimentos de êxito letal com as sementes inteiras os primeiros sintomas foram observados entre 15 e 30 horas

[1] Aceito para publicação em 9 de maio de 1996.

[2] Disciplina de Patologia Geral e Comparada, Depto Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Correia da Costa s/n, Coxipó da Ponte, Cuiabá, MT 778060-900.

[3] Projeto Saúde Animal Embrapa/UFRRJ, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23851-970.

[4] Depto Nutrição Animal e Pastagem, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 47, Seropédica, RJ 23851-970; bolsista do CNPq (305010/76-VT).

após a administração, e a evolução da intoxicação foi de 35 a 41 horas, sendo o período que passou desde a administração das sementes até a morte dos ovinos 51 a 71 horas. A dose de 5g/kg só causou leve intoxicação e os animais estavam recuperados 6 a 8 dias após a administração das sementes. Nos experimentos com êxito letal com as sementes moídas, os primeiros sintomas foram observados entre 6 e 21 horas após a administração; a evolução foi de 13 a 14 horas, sendo o período que passou desde a administração das sementes até a morte dos ovinos 21 a 33 horas. Doses de 0,937, 0,625 e 0,3125 g/kg causaram respectivamente grave, moderada e leve intoxicação com recuperação respectivamente 7, 4 e 3 dias após a administração das sementes.

O quadro clínico-patológico foi o mesmo nos ovinos que receberam as sementes inteiras ou moídas. Os principais sintomas foram cólica e diarréia fétida, com muco e fibrina (pseudomembranas). Nos animais que receberam as maiores doses, as defecações eram profusas e frequentes, às vezes sob a forma de jatos. Os achados de necropsia mais importantes foram observados no trato digestivo, desde o abomaso até o cólon, sob forma de congestão, hemorragias e edema da parede. Fibrina recobria a mucosa ou estava presente sob a forma de flocos, filamentos ou pseudomembranas no conteúdo gastrintestinal, que era líquido no intestino delgado e mucoso no intestino grosso. Os linfonodos mesentéricos eram tumefeitos. As mais importantes alterações histológicas foram encontradas no tubo digestivo, desde o abomaso até o reto, mas especialmente no abomaso, sob forma de necrose e congestão/hemorragias da mucosa, congestão e edema da submucosa e congestão da serosa.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Plantas tóxicas, intoxicação experimental por plantas, *Abrus precatorius,* Leguminosae Papilionoideae, "tento", "jiquiriti", patologia, ovinos.

INTRODUÇÃO

Abrus precatorius L., cipó da família Leguminosae Papilionoideae, com os nomes populares de "tento", "olho-de-cabra", "olho-de-pombo", e "jiquiriti", tem despertado grande interesse científico devido à natureza do princípio tóxico de sua semente, uma toxalbumina, denominada abrina. Pode-se imunizar animais contra essa toxina (Ehrlich 1891, Humphreys 1969). Com frequência essa planta é indevidamente acusada em nosso meio como responsável por mortes em bovinos, sobretudo pela larga divulgação que a toxidez de suas sementes tem recebido.

Casos de intoxicação no homem parecem ser raros, os que terminam em morte mais raros ainda (Petri 1930, Steyn 1934, Watt & Breyer-Brandwijk 1962).

Em nenhuma de nossas investigações sobre mortandades em bovinos ou outros animais de fazenda, causadas por plantas tóxicas, pudemos incriminar *A. precatorius,* o que está de acordo com os dados da literatura. Assim Gardner & Bennetts (1956) e Watt & Breyer-Brandwijk (1962) afirmam que não tem sido relatados casos de intoxicação em animais domésticos pela ingestão voluntária das sementes de *A. precatorius.* Chopra et al. (1949) relatam a intoxicação criminosa em bovinos na Índia para obtenção dos couros. Para esta finalidade as sementes são moídas e a pasta obtida é aplicada sob forma de agulhas embaixo da pele dos animais. As agulhas, de comprimento de 3/4 de polegada (1,9 cm), são preparadas de pasta obtida adicionando-se água às sementes decorticadas, pulverizadas e secadas ao sol. A morte ocorreria dentro de 18 a 24 horas. (Chopra et al. 1949, Rahman & Mia 1972)

Rahman & Mia (1972), baseados em seus experimentos com as sementes de *A.precatorius* por via oral e por via parenteral, opinam que a intoxicação devido à ingestão acidental de sementes não deve ocorrer, mas que a intoxicação criminosa pela sua aplicação parenteral é bem possível.

Em uma ocasião de mortes em equinos na Índia, em que sintomas semelhantes à intoxicação experimental pelas sementes de *A.precatorius* foram verificados, foi lembrado que a intoxicação poderia ocorrer em virtude de as sementes serem misturadas criminalmente à alimentação (Editorial 1931, Simpson & Banerjee 1932).

Convém aqui lembrar que a toxidez da abrina varia muito de acordo com a via de administração. Injetada por via endovenosa ou subcutânea, a abrina é aproximadamente 100 vezes mais tóxica do que quando administrada por via oral, por ser parcialmente inativada pelo suco gástrico. (Steyn 1934)

Em segundo lugar a semente moída ou bem mastigada seria mais tóxica do que a inteira (Steyn 1934, Kingsbury 1964, Humphreys 1988). Apesar da bem conhecida toxidez de *A. precatorius*, há poucos dados experimentais sobre a sua toxidez em animais de fazenda.

Só as sementes de *A. precatorius* têm sido demonstradas como tóxicas. As folhas recém-colhidas, administradas por via oral, em dosagens de 1,0 a 15,4 g/kg de peso do bovino, não se mostraram tóxicas (Canella et al. 1966).

Simpson & Banerjee (1932) fizeram uma série de experimentos com as sementes em diversas espécies animais. Em relação aos bovinos e caprinos, esses autores infelizmente não fornecem detalhes sobre os experimentos executados, limitando-se a observar que, com exceção de um leve aumento de temperatura nas primeiras 24 horas após a administração, todos os animais se recuperaram. Não indicam as quantidades das sementes administradas. Já em relação aos experimentos com equinos são fornecidos muitos dados. Inicialmente foram administradas a dois cavalos, duas onças (56,70 g) de sementes de *A. precatorius* finamente moídas e dadas sob forma de bolus. Um mostrou sinais de dores violentas após 8 horas, temperatura de 40ºC, seguidos por período de lassidão e temperatura subnormal. O animal apresentou anorexia e incapacidade de se levantar, vindo mais tarde a se recuperar, após tratamento com arecolina e purgantes. O segundo equino mostrou os mesmos sintomas e morreu na 16ª hora do experimento. Os achados de necropsia consistiram em inflamação do intestino com hemorragias (sic). A oito pôneis fo-

ram dadas então quantidades únicas que variaram de 5,25 dracmas (9,78 g) a 2,30 onças (65,20 g) da semente, sob forma de bolus. Todos os animais morreram dentro de 15 a 36 horas. Os achados de necropsia de dois desses pôneis consistiram em congestão e numerosas petéquias na maioria dos órgãos e tecidos. O intestino e a bexiga continham fluído sanguinolento. Não são fornecidos dados histológicos. Em outros experimentos executados por esses autores em dois pôneis foi demonstrado que pequenas quantidades das sementes, dadas repetidas vezes, causaram o desenvolvimento de "tolerância"(sic) a doses maiores. Nesses experimentos os pôneis receberam 7,1 g das sementes moídas por dia nos dois primeiros e do 11º ao 35º dia. A partir de então receberam 14,2 g por dia e do 81º ao 86º dia 56,7 g por dia. Ambos os pôneis ficaram apáticos, com anorexia e com temperatura de 40,0º e 39,4ºC no 12º dia do experimento. Depois não mais mostraram sintomas de intoxicação.

Em uma série de 44 experimentos com *A. precatorius* em bovinos (Tokarnia et al. 1970) foram administradas por via oral as sementes maduras (inteiras e moídas), em doses que variaram de 0,09 a 1,2 g/kg, e o pericarpo das favas e as favas imaturas, em doses de 0,66 a 4,2 g/kg. Nos experimentos com as sementes, a menor dose que provocou o aparecimento de sintomas de intoxicação foi de 0,09 g/kg (sementes maduras moídas), e a maior dose que não provocou sintomas foi de 0,25 g/kg (sementes maduras inteiras). O único bovino que morreu, recebeu 0,61 g/kg. (sementes maduras moídas). Os primeiros sintomas de intoxicação pelas sementes foram observados, na maioria dos experimentos, dentro de 24 horas, em poucos casos até 96 horas, após a administração. A evolução da intoxicação experimental foi aguda ou subaguda (até alguns dias). Os sintomas consistiram em anorexia e diarréia, com presença de muco e/ou fibrina, às vezes com estrias de sangue. Em alguns animais observaram-se pequenas elevações térmicas. Na única necropsia realizada verificou-se que na última porção do intestino delgado a mucosa estava avermelhada, com conteúdo mucoso. Todo o sangue se apresentou com coloração vermelho-viva. Os exames histopatológicos revelaram congestão da mucosa e submucosa intestinal, com necrose das camadas superficiais da mucosa; no baço e linfonodos havia atrofia dos centros dos folículos. A administração por via oral de segunda dose igual à primeira, das sementes inteiras de *A. precatorius* (entre 0,1 e 1 g/kg), não mais provocou sintomas de intoxicação em quatro de seis bovinos; porém, os dois animais que mostraram sintomas também não mais adoeceram após a terceira dose igual às duas primeiras. O pericarpo da fava de *A. precatorius* produziu sintomas semelhantes aos das sementes em dois casos (doses de 9,6 e 4,2 g/kg). As favas verdes imaturas provocaram leves sintomas da intoxicação no único experimento realizado (com dose de 2,17 g/kg).

Rahman & Mia (1972) administraram por via oral as sementes inteiras de *A. precatorius* em doses de 60 a 70 mg/kg a três bovinos e as sementes sem casca (decorticadas) em doses de 40 a 60 mg/kg a outros três bovinos. Outros oito bovinos receberam as sementes decorticadas por via parenteral nas doses de 0,6 a 1,0 mg/kg, quatro através da aplicação por via subcutânea do extrato aquoso e outros quatro as receberam através de implante na região do pescoço de agulhas feitas de pasta das sementes decorticadas. Os bovinos que receberam as sementes por via oral não adoeceram. A administração parenteral das sementes causou intoxicação letal.

Os primeiros sintomas foram observados 6 horas após a aplicação subcutânea do extrato aquoso, e 12 horas após o implante das agulhas.

Os sintomas nos bovinos do primeiro grupo foram salivação, corrimento nasal e sintomas nervosos sob forma de andar duro, incoordenação dos movimentos, espasmos musculares clônicos, episódios de convulsões com intervalos de 3 a 6 minutos, que podiam ser precipitados ou prolongados por barulho. Nos bovinos que receberam os implantes, havia além da salivação e do corrimento nasal, inchação no local do implante, que era moderadamente duro e muito doloroso, e havia febre a partir do segundo dia, perdurando por 2 ou 3 dias. Sintomas nervosos como no primeiro grupo também foram observados na fase final da intoxicação. Dois dos quatro animais que receberam a semente por via subcutânea e quatro dos oito que a receberam por implante de agulhas, foram tratados com transfusões de sangue hiperimune; um do primeiro grupo e três do segundo se recuperaram. Os não tratados todos morreram, os do primeiro grupo dentro de 24 horas, os do segundo grupo dentro de 4 dias após a intoxicação.

À necropsia não foram constatadas alterações nos bovinos que receberam o extrato aquoso das sementes por via subcutânea, porém nos que receberam os implantes havia edema inflamatório extenso no tecido subcutâneo ao redor do local do implante, com presença de depósitos fibrinosos. Os linfonodos regionais estavam aumentados, edematosos e hemorrágicos. Havia petéquias e equimoses no endocárdio.

Para os tratamentos acima mencionados Rahman & Mia (1972) hiper-imunizaram um bovino, aplicando por via subcutânea uma solução aquosa de 15 mg de sementes decorticadas de *A. precatorius.* Esta aplicação inicial era seguida por quatro inoculações subcutâneas de suspensão aquosa de 50, 150, 400 e 700 mg da semente decorticada pulverizada, com intervalos de 10 dias entre si. Injeções de reforço da suspensão aquosa de 250 mg das sementes decorticadas eram dadas a cada mês para manter um nível elevado de anticorpos.

Barri et al. (1990) realizaram experimentos com as sementes moídas de *A. precatorius,* administradas por sonda gástrica, em oito caprinos, com 9 a 10 meses de idade. Três receberam 2g/kg/dia durante 2 dias e morreram entre os dias 2 e 3 do experimento, três receberam 1g/kg/dia, dois durante 2 dias e o terceiro durante 5 dias, e morreram entre os dias 3 e 5 do experimento; dois receberam 0,5 g/kg por dia durante 30 dias, um deles morrendo no dia 32,

o outro tendo sido sacrificado "in extremis" no dia 33 do experimento.

Os principais sintomas de intoxicação foram inapetência, diarréia sanguinolenta, dispnéia, desidratação, emagrecimento e decúbito. Os achados de necropsia mais importantes, presentes em todos caprinos, foram hemorragias difusas na mucosa do rúmen, retículo, abomaso e intestino, e edema e enfisema pulmonares. As alterações histológicas do tubo gastrintestinal foram hemorragias, congestão, acúmulo de polimorfonucleares e perda focal de epitélio do abomaso e intestino em todos os caprinos. Congestão, hemorragias e enfisema pulmonares foram observados nos caprinos que receberam as doses de 1 a 2 g/kg/dia; edema pulmonar era mais marcado nos animais que receberam 0,5 g/kg/dia. Distrofia gordurosa hepática focal e necrose, congestão e hemorragias foram vistas no fígado de todos os caprinos. No rim foram verificadas hemorragias e congestão tanto no córtex como na medula, e degeneração e/ou necrose das células dos túbulos contornados proximais nos caprinos que ingeriram 1 e 2 g/kg/dia das sementes de *A. precatorius*.

O objetivo do presente trabalho foi determinar a dose letal para ovinos, tanto das sementes inteiras como das moídas de *Abrus precatorius*, quando administradas em doses únicas, por via oral, bem como o quadro clínico-patológico da intoxicação nessa espécie animal.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Abrus precatorius* (fam. Leg. Papilionoideae) maduras, inteiras e trinturadas, foram administradas por via oral, em doses únicas a nove ovinos, machos e fêmeas, adultos e jovens, sem raça definida, pesando entre 14,5 e 33 kg. Para os experimentos com as sementes inteiras utilizou-se como aplicador uma seringa com a extremidade anterior cortada. Para os experimentos com as sementes moídas estas eram moídas em moinho martelo no mesmo dia de sua utilização. Eram suspensas em água, usando-se uma garrafa para administração oral.

Para as sementes inteiras as doses foram 7,5 g/kg e 5,0 g/kg em dois ovinos, para cada dose. Para as sementes moídas usou-se um ovino para cada uma das doses de 2,5, 1,25, 0,937, 0,625 e 0,3125 g/kg. (Quadro 1)

As sementes foram coletadas nos meses de julho e agosto de 1993 e 1995, no município de Seropédica, Rio de Janeiro.

Os animais eram mantidos em baias individuais de alvenaria, com piso cimentado. Recebiam capim angola (*Brachiaria mutica)* inteiro e água à vontade. Antes da administração das sementes, os ovinos eram submetidos a um jejum prévio de 24 horas.

Os ovinos eram examinados antes e após a administração das sementes, com uma frequência mínima de 4 vezes por dia; na fase terminal eram assistidos continuamente. Auscultavam-se o coração, pulmão e rúmen, media-se a temperatura retal e observavam-se comportamento, apetite, dipsia, aspecto das fezes e da urina, além de dispensar-se atenção especial para alterações do aparelho digestivo.

Nos animais que morreram a necropsia era realizada imediatamente após a morte; fragmentos dos diversos órgãos eram coletados para exame histológico. Esses eram fixados em formol a 10%, processados pelos métodos rotineiros, e após inclusão em parafina eram cortados em micrótomo e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

RESULTADOS

Os principais dados sobre os experimentos com as sementes de *Abrus precatorius* em ovinos são apresentados no Quadro 1. Os dois ovinos que receberam a dose de 7,5 g/kg das sementes inteiras adoeceram gravemente e morreram ao término de 70h55min (Ov. 5089) e 50h33min (Ov. 5078) após a administração. Os primeiros sintomas foram observados 15h28min (Ov. 5078) e 29h38min (Ov. 5089) após a administração. A evolução da intoxicação foi de 35h05min (Ov. 5078) e 41h17min (Ov. 5089).

Os dois ovinos que receberam 5 g/kg adoeceram levemente e se recuperaram num período de 6 dias (Ov. 5087) e 8 dias (Ov. 5091) após o início da administração das sementes.

Com as sementes moídas as doses de 2,5 g/kg (Ov. 5143) e 1,25 g/kg (Ov. 5134) foram letais, causando a morte dos animais respectivamente ao término de 20h41min e 33h15min, após a administração. Os primeiros sintomas foram observados 6h25min e 20h40min, após a administração. A evolução da intoxicação nesses ovinos foi de 14h16min e 12h35min.

As doses de 0,937, 0,625 e 0,3125 g/kg causaram intoxicação grave, moderada e leve, respectivamente, com recuperação dos animais após 7, 4 e 3 dias da administração das sementes.

A sintomatologia, as alterações à necropsia e as lesões histológicas foram as mesmas nos animais que receberam as sementes inteiras ou moídas.

Os principais sintomas (Quadro 2) eram relacionados com o aparelho digestivo, merecendo destaque a cólica e a diarréia fétida, com muco e fibrina, que muitas vezes formava verdadeiros moldes do tubo intestinal (pseudomembranas). Nos animais que receberam as doses maiores, as defecações eram profusas e frequentes, às vezes sob a forma de jatos.

As alterações macroscópicas (Quadro 3) mais importantes ocorreram no abomaso, intestino delgado, ceco e cólon e consistiram em congestão, hemorragias e edema da parede intestinal, presença de fibrina recobrindo a mucosa, ou sob a forma de flocos, filamentos ou pseudomembranas no conteúdo intestinal; este era líquido no intestino delgado e mucoso no intestino grosso. Os linfonodos mesentéricos se apresentaram tumefeitos.

As alterações histológicas (Quadro 4) mais importantes foram verificadas, com exceção do ovino 5089, no tubo digestivo, especialmente no abomaso, onde havia necrose de coagulação da maior parte da mucosa associada à congestão/hemorragias. Neste órgão havia ainda congestão e edema da submucosa. Nas outras partes do tubo digestivo, desde o jejuno até o reto, foram verificadas lesões de intensidade menor, como necrose de coagulação do estroma com a presença de fragmentos nucleares na própria, restrita à parte superior da mucosa é geralmente associada à congestão/hemorragias, e ainda congestão e edema da

Quadro 1. Delineamento dos experimentos em ovinos com sementes maduras de *Abrus precatorius,* inteiras ou moídas

Ovinos		Administração			Desfecho	Início dos sintomas após administração das sementes	Evolução	Morte após administração das sementes	Recuperação após administração das sementes
Nº (Reg. SAP)	Peso kg	Data	Quantidade g	Dose g/kg					
Sementes inteiras									
5087	14,5	14.7.93	75	5	Adoeceu levemente	20h 17min	120h 05 min (5 dias)	-	140h 22min (6 dias)
5091	32,5	19.7.93	160	5	Adoeceu levemente	21h 17min	184h 40min (8 dias)		205h 57min (8 dias e meio)
5089 (27131-35)	16,5	17.7.93	113,75	7,5	Morreu	29h 38min	41h 17min	70h 55min (3 dias)	-
5078 (27125-29)	22,5	5.10.93	169	7,5	Morreu	15h 28min	35h 05min	50h 33min	-
Sementes moídas									
5143 (27974-82)	24	8.2.96	60	2,5	Morreu	6h 25min	14h 16min	20h 41min	-
5134 (27983-91)	27	11.2.96	31,25	1,25	Morreu	20h 40min	12h 35min	33h 15min	-
5142	24	10.2.96	22,5	0,937	Adoeceu gravemente	7h	161h (7 dias)	-	168h (7 dias)
5135	33	13.2.96	20,63	0,625	Adoeceu moderadamente	17h 05min	96h 20min (4 dias)	-	113h 25min (4 dias e meio)
5140	29	13.2.96	9,06	0,3125	Adoeceu levemente	17h	48h 20min	-	65h 20min (3 dias)

Quadro 2. Sintomatologia da intoxicação experimental em ovinos pelas sementes maduras de *Abrus precatorius*, inteiras ou moídas

	Sementes inteiras				Sementes moídas				
Ovino nº / Sintomas	5087	5091	5089	5078	5143	5134	5142	5135	5140
Anorexia	P[a]	P	P	P	P	P	A	P	A
Inapetência	P	P	P	P	P	P	P	P	A
Apatia	P	P	P	P	P	P	P	P	A
Elevação da temperatura (na fase inicial)	P	A	P	A	A	A	P	P	P
Hipomotilidade ruminal	P	P	P	P	P	P	A	A	A
Atonia ruminal	A	A	A	P	P	P	A	A	A
Tremores musculares (no início)	A	A	A	P	P	P	P	P	A
Congestão da mucosa ocular	A	P	P	P	P	A	A	A	A
Fezes pastosas	P	P	A	A	P	A	P	P	P
Fezes líquidas, com muco e fibrina (pseudomembranas) e fétidas	P	P	P	P	P	P	P	P	A
Sinais de cólica	A	A	P	P	P	P	P	P	A
Abdome penduloso	A	A	A	P	A	A	A	A	A
Timpanismo	A	A	A	A	A	P	A	A	A
Desidratação	A	A	P	P	P	P	P	A	A
Taquicardia	P	A	A	P	P	P	P	P	A
Dispnéia	A	A	P	P	A	P	A	A	A
Cianose	A	A	A	P	A	A	A	A	A
Sialorréia	A	A	P	P	A	A	A	A	A
Fraqueza (na fase final)	A	A	P	P	P	P	P	A	A
Hipotemia terminal	A	A	P	P	P	P	A	A	A
Intensidade dos sintomas	+	+	+++	+++	+++	+++	++(+)	++	(+)
Quantidades de sementes ingeridas	75g	160g	113,75g	169g					
Quantidades de sementes eliminadas com as fezes	21=2g	91=10g	Não coletadas	218=20g					
Quantidade de sementes no trato intestinal, à necropsia	-	-	12g	35g					

[a] P =Presente, A= Ausente.

Quadro 3. Principais alterações macroscópicas na intoxicação experimental em ovinos pelas sementes maduras de *Abrus precatorius*, inteiras ou moídas

Órgão	Lesão	Sementes inteiras		Sementes moídas	
		Ov.5089	Ov.5078	Ov.5143	Ov.5134
Rúmen	Congestão das papilas	-	+(átrio)	+(saco dorsal)	-
Abomaso	Congestão/hemorragias	+	+++(difusa)	+++(mais nas dobras)	+++(mais nas dobras)
	Fibrina aderida à mucosa	+	+++	++	+++
Duodeno	Congestão/hemorragias	-	+(+)	+++	+(+)
	Edema da parede	+	+	-	-
Jejuno	Congestão/hemorragias	+(+) (porção final)	+(+)	++	+(+)
	Edema da parede	+(em segmentos)	+	-	-
Íleo	Congestão/hemorragias	+	+(+)	++(+)	(+)
	Edema da parede	+	+	-	-
Conteúdo do intestino delgado	Líquido, amarelado a esverdeado, presença de fibrina aderida à parede ou no conteúdo intestinal	++	++	++(+)	++(fétido)
Ceco	Congestão/hemorragias	++	+(+)	++	+(+)
	Edema da parede	++(+)	++	-	-
	Conteúdo mucoso	+++	+++	-	+(+)
	Conteúdo líquido	-	-	+++	+(+)
Cólon	Congestão/hemorragias	+	(+)	(+)	-
	Edema da parede	++	+	-	-
	Fibrina aderida à mucosa	-	-	(+)	-
	Conteúdo mucoso	+++	-	+++	-
	Conteúdo pastoso	-	+(e espumoso)	-	+
Reto	Conteúdo mucoso	+++	+++	++	-
Linfonodos mesentéricos	Tumefação	+(+)	+	+	+
	Congestão	-	-	++(+)	(+)
Fígado	Congestão	+	-	-	-
	Lobulação perceptível	-	+	+	-
Rim	Congestão	+	++	+(+)	-

[a] +++ Lesão acentuada, ++(+) moderada a acentuada, ++ moderada, +(+) leve a moderada, + leve, (+) discreta, - ausente.

submucosa e congestão da serosa. Nos linfonodos mesentéricos de três ovinos foi constatada, na medular, a presença de fragmentos nucleares. No baço de um ovino foi verificada, em grau acentuado, a presença de fragmentos nucleares nos folículos linfóides.

Foi visto em todos os ovinos no fígado degeneração albuminosa-granular, e no pulmão, rim e baço, congestão.

DISCUSSÃO

Os experimentos com as sementes de *Abrus precatorius* realizados em ovinos mostraram nitidamente que a ingestão das sementes inteiras é bem menos nociva do que das sementes moídas. Ficou estabelecido nesses experimentos que a dose letal para ovinos das sementes inteiras é 7,5 g/kg e das sementes moídas 1,25 g/kg; portanto a semente moída foi 6 vezes mais tóxica que a semente inteira. Mas o quadro clínico-patológico provocado é o mesmo.

O início dos sintomas após a administração das sementes, a evolução da intoxicação e o prazo desde a administração das sementes até a morte dos ovinos, foram mais curtos nos animais que receberam as sementes moídas do que nos que as receberam inteiras.

É difícil fazer comparações sobre a sensibilidade à intoxicação pelas sementes de *A. precatorius* em relação a outras espécies animais, devido à escassez de dados experimentais. O ovino parece ser mais resistente do que o bovino, equino adulto e pôneis, em que as doses letais das sementes moídas foram respectivamente 0,61 g/kg, 0,2

Quadro 4. Principais alterações histológicas na intoxicação experimental em ovinos pelas sementes maduras de *Abrus precatorius*, inteiras ou moídas

Órgão	Lesão	Sementes inteiras		Sementes moídas	
		Ov.5089 (SAP 27131-35)	Ov.5078 (SAP 27125-29)	Ov.5143 (SAP 27974-82)	Ov.5134 (SAP 27983-91)
Rúmen	Congestão da própria	-[a]	+(+)	-	-
Abomaso	Necrose de coagulação da mucosa	-	+++	+++	+++
	Congestão/hemorragias na mucosa	-	+++	+++	+++
	Congestão da submucosa	-	++(+)	+++	+++
	Edema da submucosa	+	++(+)	++(+)	+
Duodeno	Necrose de coagulação do estroma na parte superior da mucosa	+	Não coletado	++	+(+)
	Fragmentos nucleares na própria da parte superior da mucosa	-		+(+)	+(+)
	Congestão na parte superior da mucosa	-		+	+
	Congestão da submucosa	-		-	-
	Congestão da serosa	-		-	-
Jejuno	Necrose de coagulação do estroma na parte superior da mucosa	-	+	++	+(+)
	Fragmentos nucleares na própria da parte superior da mucosa	-	+	(+)	++
	Congestão da congestão na parte superior da mucosa	-	+	+	+
	Congestão da submucosa	-	++	++	+
	Edema da submucosa	-	-	+	-
	Congestão da serosa	-	++	-	-
Íleo	Necrose de coagulação do estroma na parte superior da mucosa	-	+	++	+(+)
	Fragmentos nucleares na própria da parte superior da mucosa	-	+(+)	+(+)	+(+)
	Congestão na parte superior da mucosa	-	+(+)	++	+
	Congestão da submucosa		++(+)	++	++
	Congestão da serosa	-	+(+)	-	-
Ceco	Necrose de coagulação do estroma na parte superior da mucosa	-	+	++	(+)
	Fragmentos nucleares na própria da parte superior da mucosa	-	+	(+)	(+)
	Congestão na parte superior da mucosa	-	+	++	+
	Edema da submucosa	-	-	+	-
	Congestão da submucosa	-	+(+)	++	++
	Congestão da serosa	-	+	-	-
	Necrose de coagulação no estroma na parte superior da mucosa	-	-	+	-
Cólon	Fragmentos nucleares na própria da parte superior da mucosa	-	-	+	-
	Congestão na patre superior da mucosa	-	-	+	-
	Congestão da submucosa	-	+	-	-
	Congestão da serosa	-	-	-	+
	Necrose de coagulação no estroma na parte superior da mucosa	-	++	(+)	-
Reto	Fragmentos nucleares na própria da parte superior da mucosa	-	++	+	(+)
	Congestão na parte superior da mucosa	-	+	+	(+)
Fígado	Degeneração albuminosa granular	+	+	+	+
Pulmão	Congestão	(+)	+	+	+
Rim	Congestão	-	+	+	++
Baço	Congestão	-	++	+(+)	++
	Fragmentos nucleares nos folículos linfóides	-	-	-	++
Linfonodos mesentéricos	Fragmentos nucleares na medular	-	+	+	+
	Fragmentos nucleares nos folículos linfóides	(+)	-	-	-
Linfonodos externos	Fragmentos nucleares nos folículos linfóides	(+)	-	-	-

[a] +++ Lesão acentuada, ++(+) moderada a acentuada, ++ moderada, +(+) leve a moderada, + leve, (+) discreta, - ausente.

g/kg e 0,06 g/kg. Em relação às sementes inteiras somente há dados em bovinos, em que 1 g/kg causou doença, mas não foi fatal. Não se pode usar para comparações os dados de Barri et al. (1990) em caprinos, pois os experimentos consistiram em administrações repetidas das sementes.

O quadro clínico-patológico na intoxicação experimental provocada por nós pela administração por via oral das sementes de *A. precatorius* em ovinos, caracterizado por gastrenterite, afetando o trato digestivo desde o abomaso até o reto, está, de uma maneira geral, de acordo com o que tem sido observado nos experimentos em outras espécies animais, quando aplicadas por via oral, apesar de ser difícil fazer comparações mais detalhadas devido a escassez de dados fornecidos na bibliografia a respeito. É preciso ter cuidado ao se fazer comparações com dados da literatura, pois nem sempre fica bem claro se as descrições, sobretudo dos achados de necropsia e das alterações histológicas, se referem às sementes administradas por via oral ou parenteral, e qual a espécie animal envolvida (Petri 1930, Steyn 1934, Völker 1950).

Nos experimentos realizados por Rahman & Mia (1972), em que adoeceram e morreram os bovinos que receberam a semente por via parenteral, não foram observados sintomas relativos ao aparelho digestivo, mas sim nervosos. Na necropsia só foi encontrado edema inflamatório fibrinoso na região em que foram aplicadas as agulhas feitas da pasta das sementes.

Agradecimento.- Ao assistente de Pesquisa João Luis Bastos pela valiosa colaboração na coleta das sementes de *A. precatorius*.

REFERÊNCIAS

Barri M.E.S., El-Dirdiri N.I., Abu-Damir H. & Idris O.F. 1990. Toxicity of *Abrus precatorius* in Nubian goats. Vet. Human Toxicol. 32 (6):541-545.

Canella C.F.C., Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1966. Experimentos com plantas tidas como tóxicas realizadas em bovinos no Nordeste do Brasil com resultados negativos. Pesq. Agropec. Bras. 1:343-350.

Chopra R.N., Badhwar A.L. & Ghosh S. 1949. Poisonous Plants of India. Vol.1. Scient. Monogr. nº 17, Indian Council Agric. Res., Govt India Press, Calcutta.

Editorial (1931). Poisoning of horses by ratti seeds. J. Roy. Army Vet. Corps 3:13.

Ehrlich P. 1891. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. II. Ueber Abrin. Dtsch. Med. Wschr. No. 44: 1218-1219.

Gardner C.A. & Bennetts H.W. 1956. Toxic Plants of Western Australia. West Australian Newspapers, Perth.

Humphreys D.J. 1969. The toxic factors of the seeds of *Abrus precatorius*. Phytochemistry 8:2397-2400.

Humphreys D.J. 1988. Veterinary Toxicology. 3rd ed. Bailliére Tindall, London.

Kingsbury J.M. 1964. Poisonous Plants of the United States and Canadá. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Petri E. 1930. Pathologische Anatomie und Histologie der Vergiftungen. Verlag J. Springer, Berlin.

Rahman A. & Mia A.S. 1972. *Abrus precatorius* poisoning in cattle. Indian Vet. J. 49:1045-1049.

Simpson K.S. & Banerjee P.C. 1932. Cases of poisoning in the horse with ratti seeds (*Abrus precatorius*), by oral administration. Ind. J. Vet. Sci. 2:59-65.

Steyn D.G.1934. The Toxicology of Plants in South Africa. Central News Agency, South Africa.

Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Monteiro M.C. 1970. Intoxicação experimental em bovinos pela semente de *Abrus precatorius*. Pesq. Agropec. Bras. 5:441-452.

Völker R. 1950. Eugen Fröhners Lehrbuch der Toxikologie für Tierärzte. 6. Aufl. Ferdinand Enke, Stuttgart.

Watt J.M. & Breyer-Brandwijk M.G. 1962. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. 2nd ed. E. and S. Livingstone, Edinburgh.

Pesq. Vet. Bras. 16(2/3):67-74, abr./set. 1996

EPIDEMIOLOGIA E QUADRO CLÍNICO DO BOTULISMO EPIZOÓTICO DOS BOVINOS NO ESTADO DE SÃO PAULO[1]

Julio Augusto N. Lisbôa[2], Marcio R.G. Kuchembuck[3], Iveraldo S. Dutra[4], Roberto C. Gonçalves[3], Clóvis T. Almeida[3] e Ivan R. Barros Filho[5]

ABSTRACT.- Lisbôa J.A.N., Kuchembuck M.R.G., Dutra I.S., Gonçalves R.C., Almeida C.T. & Barros Filho I.R. 1996. [**Epidemiological and clinical aspects of the epizootic botulism of cattle in the State of São Paulo.**] Epidemiologia e quadro clínico do botulismo epizoótico dos bovinos no Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira 16(2/3):67-74.* Depto Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, C.P. 6001, Londrina, PR 86051-970, Brazil.

In order to investigate epidemiological and clinical aspects of beef cattle mortalities caused by botulism, a syndrome popularly known as "doença da vaca caída", studies were carried out in 32 naturally affected 4 to 9 year old cows, 27 belonging to the Nellore breed and 5 to crossbred Nellore, all from 27 farms located in municipalities near Botucatu, State of São Paulo. The epidemiological and clinical features were based, respectively, on the farm and herd managements, and on the general physical examination of the cows. Mouse bioassay and complement microfixation tests were performed to detect the presence of botulinum toxins in liver samples. The results showed that the disease occurs in beef cattle of range breeding systems, reared under inadequate mineral nutrition and deficient health management. Pregnant and milking cows represented the group at risk, and the incidence was higher during the rainy season (December to March), with morbidity and mortality rates of 3,2 ± 3,6%. Clinical examination revealed cows with no alterations of vital signs, behavior, visual and auditory acuities and skin sensation; but revealed ruminal hypomotility, anorexia, dehydration, flaccid para or tetraparesis with permanent recumbency, and a paretic or paralytic tongue. The diagnosis of botulism, involving type C and D toxins, was consistent with the epidemiological and clinical findings.

INDEX TERMS: Cattle, epizootic botulism, epidemiology, clinical signs.

SINOPSE.- Com o objetivo de verificar aspectos epidemiológicos e clínicos da mortalidade de vacas de corte causada pelo botulismo, popularmente conhecida como "doença da vaca caída", estudaram-se 32 vacas (27 da raça Nelore e 5 mestiças), entre 4 e 9 anos de idade, naturalmente acometidas, e pertencentes a 27 propriedades rurais distintas, localizadas em 17 municípios próximos a Botucatu, Estado de São Paulo. As caracterizações da epidemiologia e do conjunto de sintomas basearam-se, respectivamente, no histórico dos rebanhos acometidos e no exame clínico das vacas estudadas, com análise estatística descritiva. Empregaram-se as provas de inoculação em camundongos e de microfixação de complemento para a detecção de toxinas botulínicas em amostras de fígado colhidas durante a necropsia dos animais. Os resultados apontaram a ocorrência da doença em rebanhos de corte, explorados extensivamente, com manejos de suplementação mineral e sanitário inadequados. A inci-

[1] Aceito para publicação em 22 maio de 1996.
Projeto financiado pela FAPESP (92/0970-1).

[2] Departamento de Clínicas Veterinárias, UEL, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, Londrina, PR 86051-970.

[3] Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu, Botucatu, SP 18618-000.

[4] Departamento de Medicina Veterinária, FOA, Unesp, Campus de Araçatuba, Caixa Postal 533, Araçatuba, SP 16015-050.

[5] Departamento de Medicina Veterinária, UFPR, Campus Universitário, Curitiba, PR 80001-970.

dência foi maior de dezembro a março, em vacas prenhes ou lactantes, com coeficientes de morbidade e mortalidade de 3,2 ± 3,6%. Clinicamente observaram-se funções vitais, comportamento, visão, audição e sensibilidade cutânea normais, porém hipotonia ruminal, anorexia, desidratação, para ou tetraparesia flácidas com decúbito permanente e diminuição ou ausência do tônus da língua. O diagnóstico de botulismo, com envolvimento das toxinas tipos C e D, foi coerente com as observações epidemiológicas e clínicas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bovinos, botulismo epizoótico, epidemiologia, sintomas.

INTRODUÇÃO

Desde o início da década passada, os pecuaristas e técnicos brasileiros têm a sua atenção voltada para a crescente mortalidade de vacas nos rebanhos de corte, a qual vem determinando expressivos prejuízos econômicos pelo número elevado de animais envolvidos, e, recebeu denominações variadas, sobretudo "doença da vaca caída".

Dentre os aspectos epidemiológicos apontam-se as vacas como a categoria predominantemente acometida, especialmente se prenhes ou lactantes, pertencentes a rebanhos de corte mantidos em regime de manejo extensivo, geralmente com suplementação de fósforo inadequada, registrando-se o maior número de casos na época das chuvas e a elevada incidência nas regiões de cerrado (Döbereiner et al. 1990, 1992, Dutra 1991).

O quadro clínico é, em geral, de caráter agudo (evolução de 24 a 72 horas), caracterizando-se por uma incoordenação dos membros posteriores, decúbito esternal permanente evoluindo para lateral e morte, com apetite variável e estado mental normal (Döbereiner et al. 1990, 1992, Real et al. 1991, Dutra 1991), o que encontra forte compatibilidade com as descrições do conjunto de sintomas observado em bovinos acometidos pela intoxicação botulínica (Henning 1949, Tokarnia et al. 1970, Blood & Radostits 1989, Mayhew 1989).

De fato, o diagnóstico epidemiológico e clínico-patológico de botulismo, defendido em diferentes oportunidades para explicar o problema sanitário em questão (Tokarnia et al. 1988, Döbereiner et al. 1990, 1992, Dutra 1991), foi consistentemente confirmado com o trabalho de Dutra et al. (1993) ao empregarem o teste de microfixação de complemento (Weiss & Weiss 1988), método laboratorial com sensibilidade superior ao exame clássico de inoculação em camundongos, possibilitando a detecção das toxinas botulínicas tipos C e D em amostras provenientes de animais naturalmente acometidos.

Em vista das considerações anteriores e, utilizando-se vacas da raça Nelore e suas mestiças manifestando quadro clínico compatível e pertencentes a rebanhos acometidos pelo problema em municípios próximos a Botucatu, Estado de São Paulo, o presente trabalho traz como objetivos o estudo da epidemiologia da doença em seus diferentes aspectos, a caracterização do quadro sintomatológico e a investigação laboratorial da presença das toxinas botulínicas tipos C e D em amostras de fígado, como meio de confirmar o diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Selecionaram-se para o estudo 32 fêmeas bovinas, sendo 27 da raça Nelore e 5 mestiças, com idade variando entre 4 e 9 anos, possuindo história e quadro clínico, individual e de rebanho, compatíveis com o problema em questão, e pertencentes a 27 propriedades rurais, localizadas em 17 municípios relativamente próximos a Botucatu, Estado de São Paulo.

Foram descartados todos os animais com evidências clínicas e/ou anatomo-patológicas da presença de outros processos patológicos concomitantes, bem como, com resultado positivo para raiva no exame rotineiro de imunofluorescência direta.

Colheita de material

Amostras de aproximadamente 100g de tecido hepático, totalizando 28 unidades, foram colhidas durante a realização do exame necroscópico dos animais, utilizando-se facas limpas de aço inoxidável, sendo identificadas individualmente e conservadas por congelamento.

Estudo epidemiológico

O levantamento epidemiológico, referente às 27 propriedades rurais incluídas no estudo, baseou-se nas informações obtidas com os proprietários e/ou tratadores e nas evidências "in loco" quando da visitação, registrando-se em questionário específico.

Os dados sofreram análise ou classificação em diferentes tópicos relacionados a seguir, abrangendo-se a caracterização do manejo e rebanho (tipo de manejo e de exploração); a nutrição mineral (tipo de suplemento utilizado, frequência de suplementação e tipo de cocho empregado para tal finalidade); o manejo sanitário (frequência de vermifugações, tipos de vacinações, frequência de assistência médico veterinária e possibilidade de osteofagia segundo a presença de ossos e/ou carcaças em áreas destinadas ao pastoreio); e a epidemiologia da doença (época de ocorrência do problema em relação aos meses do ano, categoria animal afetada, estado fisiológico provável das vacas acometidas e coeficientes de morbidade, mortalidade e letalidade), considerando-se nesta última abordagem as informações referentes ao total de 332 animais acometidos nas diferentes propriedades estudadas.

Exame clínico

Das 32 vacas incluídas no trabalho, somente 26 participaram do estudo clínico uma vez que as demais morreram anteriormente à abordagem inicial, impossibilitando a realização do exame rotineiro, o qual, seguindo os preceitos clássicos (Blood & Radostits 1989, Dirksen et al. 1993), constituiu-se na avaliação das funções vitais (temperatura

e frequências cardíaca, respiratória e de movimentos ruminais); coloração das mucosas e estado de hidratação, classificando-se o grau de desidratação, quando presente, em leve (5 a 8%), moderado (8 a 10%) e grave (acima de 10% do peso vivo); além dos sistemas tegumentar, linfático, respiratório, cardiovascular, digestivo e urogenital.

O exame clínico neurológico consistiu na avaliação de postura; do estado mental, o qual segundo a intensidade de resposta aos estímulos externos sofreu classificação em alerta (resposta normal), apatia (relativa indiferença aos estímulos) e depressão (ausência de resposta); das acuidades visual e auditiva; do tônus muscular nos membros; do tônus da língua, testado por meio da exposição manual do órgão e classificado como normal (exposição dificultosa), diminuído (exposição com relativa facilidade seguida por recolhimento espontâneo à cavidade oral) e ausente (protrusão permanente, ou facilidade de exposição sem o recolhimento imediato à cavidade oral); assim como, da presença de sensibilidade cutânea na região paravertebral e nos membros, testada através de leves toques com o bisel de agulhas hipodérmicas na pele.

Métodos de diagnóstico para o botulismo

Realizaram-se dois métodos distintos para a verificação da presença de toxinas botulínicas nas amostras de fígado colhidas: o teste de inoculação intraperitonial em camundongos (ensaio biológico) seguido pela prova de soroneutralização quando de resultados positivos, segundo a metodologia clássica e empregada por Tokarnia et al. (1970), e, o teste de microfixação de complemento segundo a técnica de Weiss & Weiss (1988), utilizando-se as antitoxinas botulínicas C e D, gentilmente cedidas pelo "Staatens Serum Institut" de Copenhagen, Dinamarca.

A metodologia laboratorial empregada, envolvendo ambos os exames, desde o preparo inicial das amostras, encontra-se detalhadamente descrita no estudo de Dutra et al. (1993).

O exame de soroneutralização foi procedido em unicamente quatro amostras positivas no ensaio biológico, em razão da não disponibilidade de suficientes quantidades das antitoxinas específicas.

Métodos estatísticos

Efetuou-se um estudo estatístico descritivo para o conjunto de variáveis quantitativas determinando-se medidas de tendência central e de dispersão, assim como as distribuições de frequência para as variáveis qualitativas (Berquó et al. 1980).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo epidemiológico

A Figura 1 mostra a área de abrangência do estudo destacando os municípios onde se localizavam as propriedades cujos dados permitiram o enfoque epidemiológico.

Os resultados do estudo epidemiológico, por sua vez, estão apresentados nas Figuras 2 a 11, mostrando que a

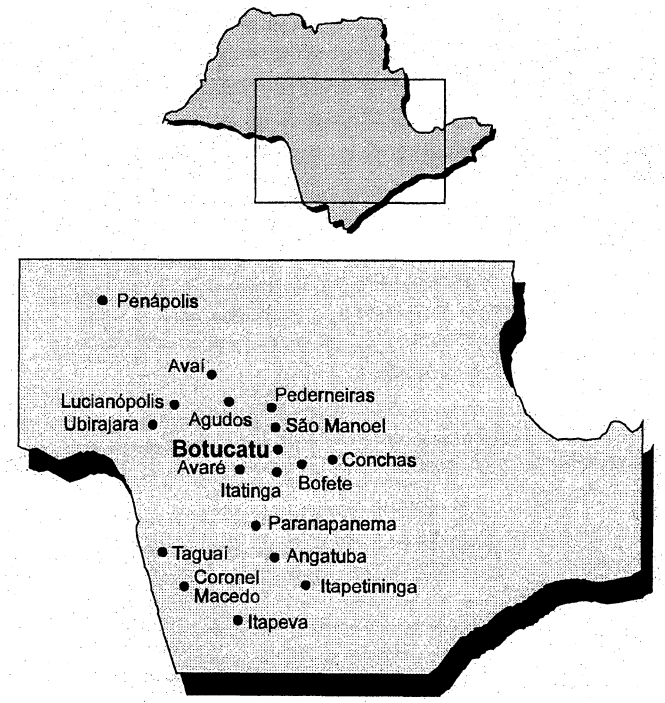


Fig. 1. Apresentação da região de abrangência do estudo no Estado de São Paulo, com indicação dos municípios de localização das propriedades rurais afetadas pelo problema de mortalidade.

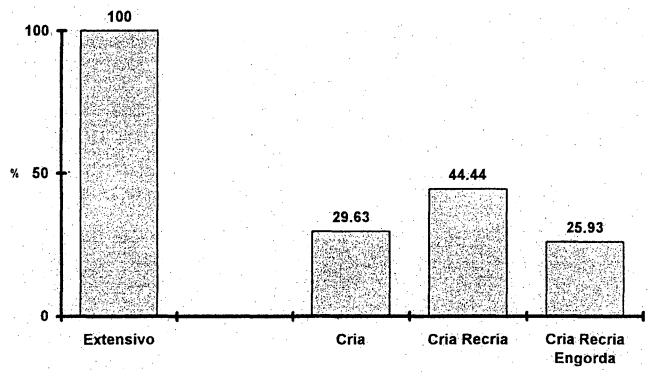


Fig. 2. Caracterização do tipo de manejo e do tipo de exploração empregados nas propriedades rurais (n=27) onde se verificou o problema de mortalidade bovina, no Estado de São Paulo.

mortalidade se evidenciou em condições de criação extensiva com exploração do rebanho para reprodução (Fig. 2) sendo ainda digno de nota que todas as propriedades se localizavam em áreas de cerrado, com solos arenosos e a maior parte das pastagens formadas por capins do gênero *Brachiaria* (89,61%), características coerentes com a ocor-

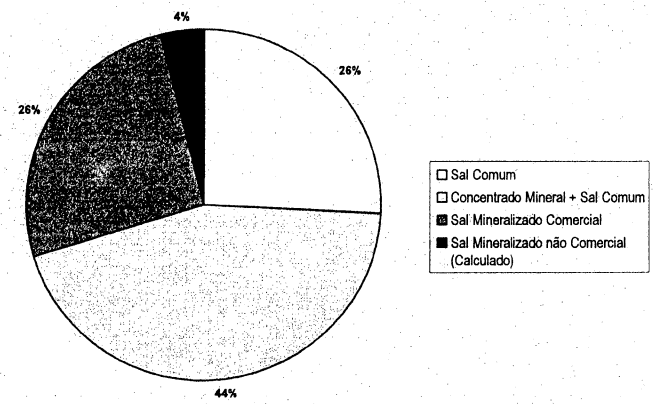


Fig. 3. Tipo de suplemento mineral utilizado nas propriedades rurais (n=27) onde se verificou o problema de mortalidade bovina, no Estado de São Paulo.

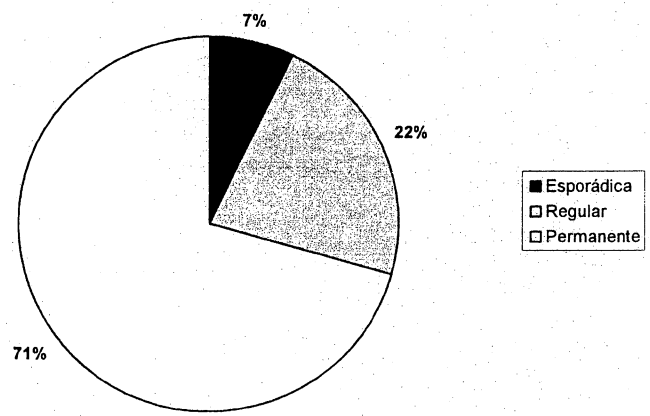


Fig. 4. Frequência de suplementação mineral praticada nas propriedades rurais (n=27) onde se verificou o problema de mortalidade bovina, no Estado de São Paulo.

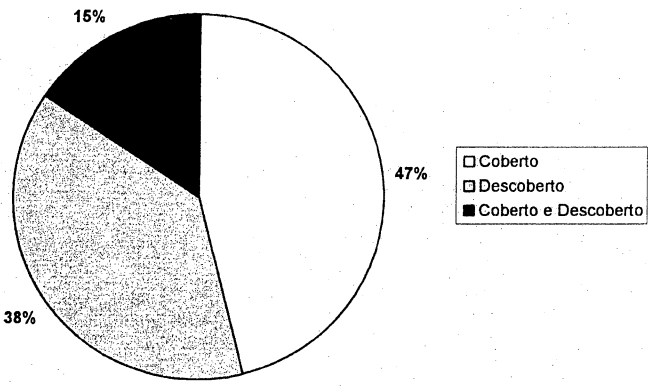


Fig. 5. Tipos de cochos utilizados para a suplementação mineral nas propriedades rurais (n=27) onde se verificou o problema de mortalidade bovina, no Estado de São Paulo.

rência do problema em varias regiões do País, conforme as citações de Tokarnia et al. (1988), Döbereiner et al. (1990, 1992) e Dutra (1991), por serem áreas deficientes em fósforo.

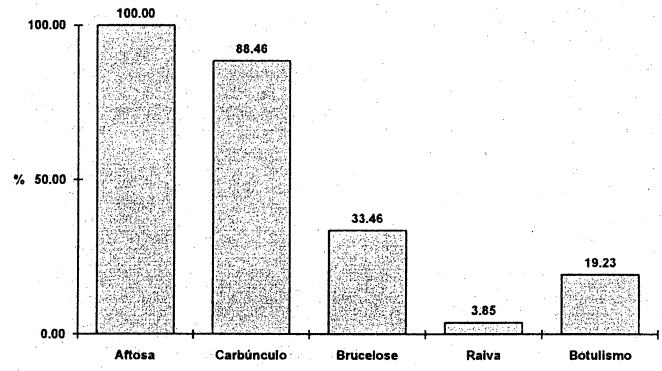


Fig. 6. Tipos de vacinações realizadas nas propriedades rurais (n=27) onde se verificou o problema de mortalidade bovina, no Estado de São Paulo.

O exame conjunto das Figuras 3, 4 e 5 deixa claro, a exemplo do relato de Ortolani (1993), a existência de falhas no manejo de nutrição mineral dos rebanhos acometidos, quer seja quanto ao tipo de suplemento utilizado, quer quanto à frequência de oferta ou tipo de cocho empregado para esta finalidade. E, embora não tenha sido possível averiguar a facilidade de acesso dos animais aos cochos destinados à suplementação mineral, parece razoável admitir que a presença de pelo menos um cocho para cada divisão de pastagem, observada na maioria das propriedades (80,77%), possa ser considerada satisfatória. Por outro lado, cada cocho atendia, em média, 51,6 ha de pasto, com uma variação de 16,6 a 128,0 ha, área aparentemente extensa em demasia para algumas situações, o que pode supostamente prejudicar o consumo do suplemento.

Com respeito ao manejo sanitário, os dados de vermifugação, realizada a intervalos semestrais (26,9%) ou quadrimestrais (46,1%), e de vacinação (Fig. 6) são relativamente semelhantes àqueles indicados por Ortolani (1993), destacando-se que a imunização contra o botulismo não era uma prática de rotina, e na maioria das vezes fora realizada recentemente (há no máximo 45 dias) após o

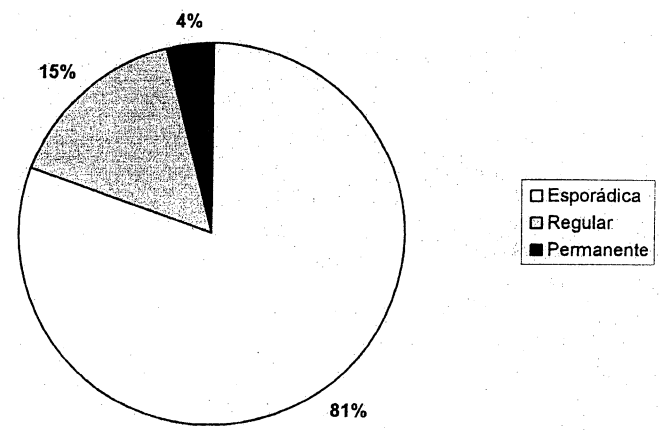


Fig. 7. Frequência de assistência médico veterinária nas propriedades rurais (n=27) onde se verificou o problema de mortalidade bovina, no Estado de São Paulo.

surgimento do problema de mortalidade. Adicionalmente, em coerência com o manejo padrão de gado de corte do País, somente uma reduzida porcentagem das propriedades era assistida por médico veterinário regular ou permanentemente (Fig. 7).

Na Figura 8 pode-se observar que em 65% das propriedades os rebanhos estavam sujeitos ao risco de osteofagia em função da presença, recente ou antiga, de ossos e/ou carcaças, bovinas ou não, nas áreas de pastoreio. Em seu levantamento, Ortolani (1993) apontou um risco ainda maior (95,7%), citando como comum a observação de parorexia em animais dos rebanhos atingidos, situação anteriormente registrada por Tokarnia et al. (1970), ao concluírem o diagnóstico de botulismo, investigando mortalidades bovinas no Piauí. Em razão da limitada confiabilidade da informação, não foi possível incluir, na presente investigação, a porcentagem de rebanhos cujos animais manifestavam osteofagia.

Em relação à epidemiologia da doença, os achados condizem com as observações de Döbereiner et al. (1990, 1992), Dutra (1991) e Ortolani (1993), destacando-se o nítido padrão de comportamento sazonal com incidência mais elevada no período chuvoso do ano (Fig. 9), além de as vacas constituírem-se no grupo de mais alto risco (Fig. 10), especialmente se prenhes ou lactantes (Fig. 11), o que está de acordo ainda com os relatos de Tokarnia et al. (1970) ao estudarem rebanhos acometidos pela intoxicação botulínica. A explicação encontra-se fundamentada no conceito de que sendo as vacas, em particular durante a prenhez e a lactação, a categoria do rebanho com os mais acentuados níveis de exigência nutricional, é lógico esperar, portanto, que sejam as primeiras a manifestarem sinais de desequilíbrio quando de uma dieta deficiente em fósforo, destacando-se, dentre os mesmos, a osteofagia e ingestão de toxinas botulínicas consequentemente.

As taxas de morbidade e mortalidade resultaram, por fim, idênticas por não ter havido relato de recuperação de qualquer animal acometido, fazendo com que o índice de letalidade fosse absoluto. O resultado médio obtido (3,2 ± 3,61%), assim como o valor mais elevado (12,5%), mostraram-se inferiores aos apontados por Ortolani (1993) em outras situações geográficas de ocorrência do problema.

Estudo clínico

Das 32 vacas estudadas, 13 estavam prenhes (a maioria a partir do segundo trimestre) e 14 lactantes (quase todas no primeiro trimestre), com tempo de evolução da doença desde o início dos sintomas até a primeira abordagem oscilando de 6 a 120 horas, sendo mais frequente o intervalo entre 24 e 72 horas. Vale ressaltar que somente 26 animais participaram do estudo clínico, pois os demais estavam mortos antes do primeiro contato.

Não se observaram quaisquer alterações quanto à temperatura e frequências cardíaca e respiratória (Quadro 1), o que encontra coerência parcial com as observações de Real et al. (1991), as quais indicaram a bradicardia como um achado comum. A hipotonia ruminal foi, contudo, uma

Quadro 1. Estatística descritiva das funções vitais, temperatura (Temp), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e movimentos ruminais(MR), observadas nas vacas de corte (n=23) naturalmente acometidas pelo decúbito permanente, no Estado de São Paulo

	Temp (°C)	FC (/min)	FR (/min)	MR (/5min)
x	38,10	67,52	22,95	1,60
s	0,95	16,21	7,90	1,64
CV	2,51	24,01	34,43	102,21
LI	37,69	60,50	19,53	0,89
^{IC}LS	38,52	74,53	26,37	2,31
Md	38,50	68,00	20,00	1,00

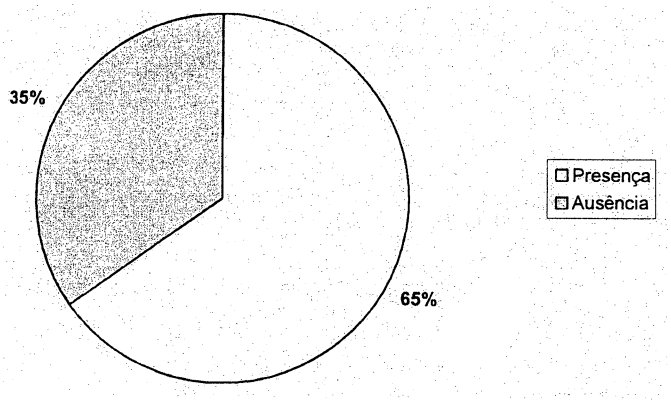


Fig. 8. Presença ou aparente ausência de ossos e/ou carcaças, recentes ou antigos, nas áreas de pasto, possibilitando o contato dos animais, nas propriedades rurais (n=27) onde se verificou o problema de mortalidade bovina, no Estado de São Paulo.

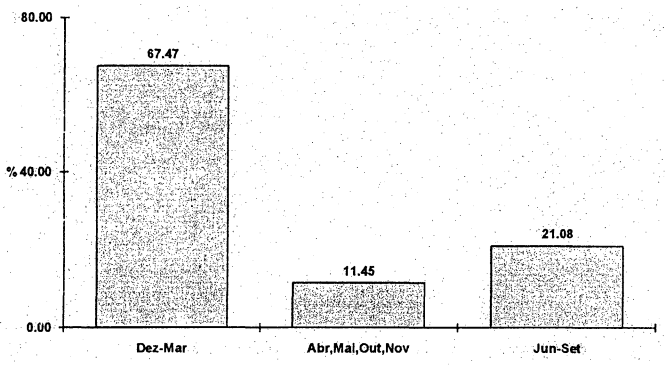


Fig. 9. Distribuição de ocorrência dos casos (n=332) segundo a época do ano nas 27 propriedades rurais incluídas no estudo, no Estado de São Paulo.

anormalidade consistente, podendo estar relacionada com a ausência de ingestão de alimentos ou água pela maior parte dos animais acometidos (88 e 76%, respectivamente), sendo o rúmen comumente encontrado não repleto e com seu conteúdo relativamente ressecado.

A maioria dos animais estudados apresentava mucosas róseas (65,3%) ou congestas (30,7%), e graus leve (52,1%) a moderado (26,1%) de desidratação, provavelmente pela

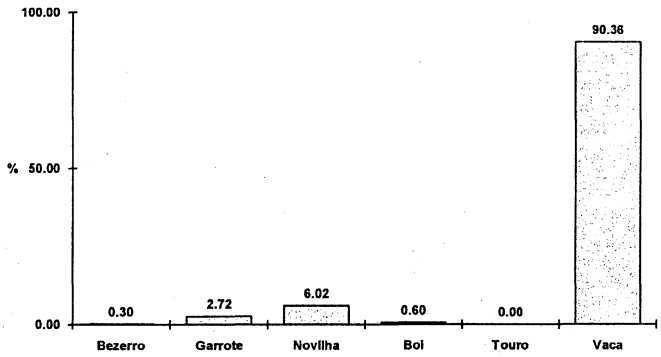


Fig. 10. Distribuição da ocorrência dos casos (n=332) segundo a categoria de animais do rebanho acometida, nas 27 propriedades rurais estudadas, no Estado de São Paulo.

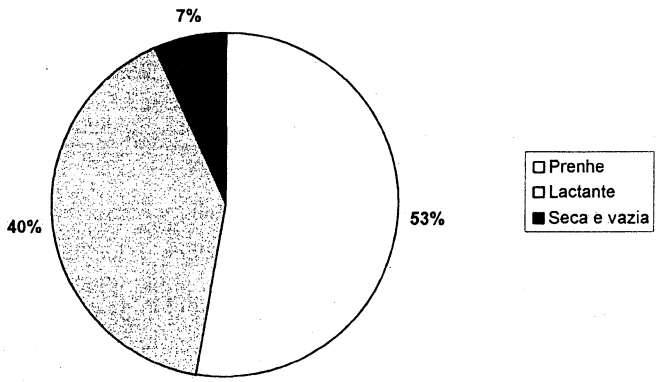


Fig. 11. Distribuição das vacas acometidas (n=300) de acordo com o seu estado fisiológico, nas 27 propriedades rurais incluídas no estudo, no Estado de São Paulo.

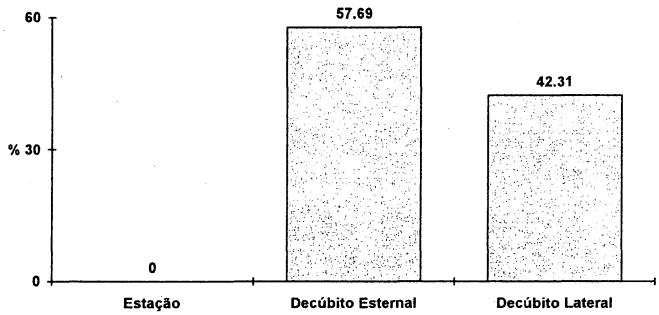


Fig. 12. Característica da postura apresentada pelas vacas de corte acometidas (n=26) no momento do primeiro exame clínico, no Estado de São Paulo.

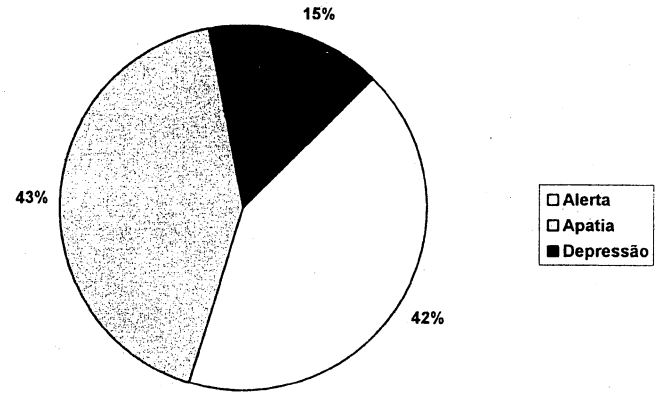


Fig. 13. Característica do estado mental demonstrado pelas vacas de corte acometidas (n=26) no momento do primeiro exame clínico, no Estado de São Paulo.

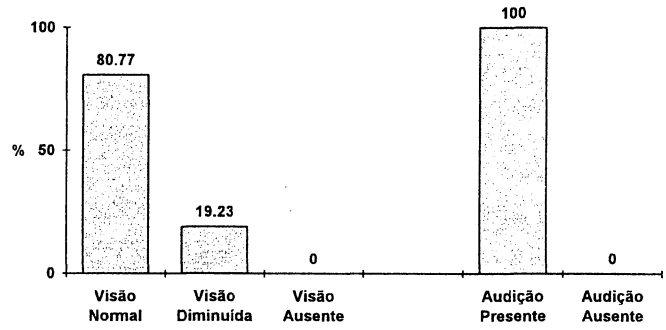


Fig. 14. Característica das acuidades visual e auditiva observadas nas vacas de corte (n=26) acometidas pelo decúbito permanente, no Estado de São Paulo.

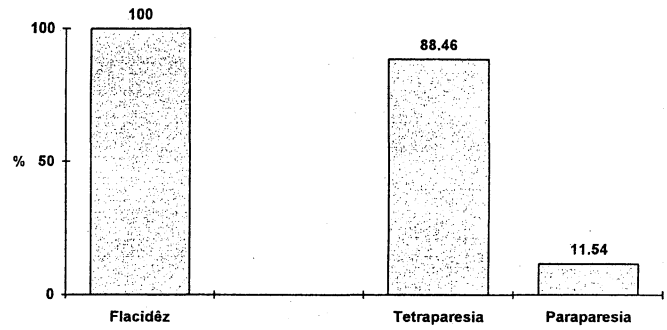


Fig. 15. Característica de tonicidade na musculatura dos membros e do tipo de paresia apresentados pelas vacas de corte (n=26) acometidas pelo decúbito permanente, no Estado de São Paulo.

ausência de ingestão de água, uma vez que não se detectou nenhum sinal aparente de perda de líquidos.

À avaliação clínica neurológica observou-se que todas as vacas encontravam-se permanentemente em decúbito esternal ou lateral (Fig. 12, 18 e 19), não sendo capazes de se manter em estação quando erguidas por sistema de guindaste. Em contrapartida somente uma minoria manifestava grave distúrbio no seu estado mental, sem evidência de interação com o meio (Fig. 13), sintoma observado unicamente nos animais em decúbito lateral, como uma tendência da evolução natural de agravamento do quadro. As demais vacas apresentavam-se alerta ou apáticas, sendo rara a detecção de perturbações quanto às acuidades visual e auditiva (Fig. 14), o que justifica, segundo Mayhew (1989), a interpretação preliminar da inexistência de encefalopatia nestes animais.

Todas as vacas examinadas apresentavam diminuição, porém nunca ausência completa, do tônus da musculatura

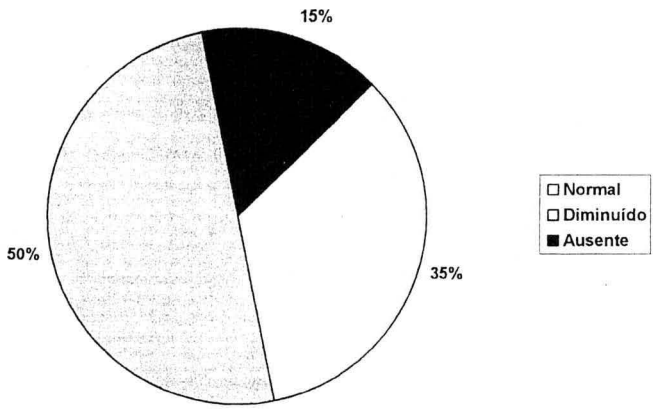


Fig. 16. Característica do tônus muscular da língua observado nas vacas de corte (n=26) acometidas pelo decúbito permanente, no Estado de São Paulo.

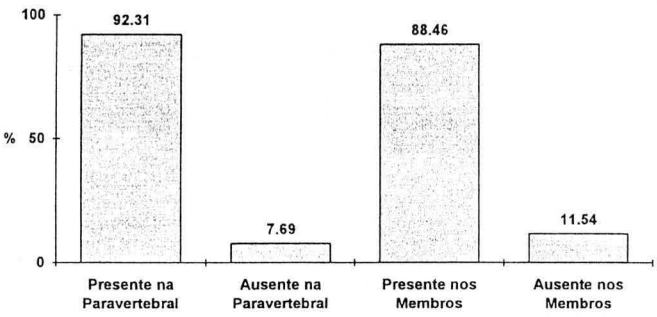


Fig. 17. Presença ou aparente ausência de sensibilidade cutânea nas regiões paravertebral e dos membros, detectadas nas vacas de corte (n=26) acometidas pelo decúbito permanente, no Estado de São Paulo.

Quadro 2. Resultados dos exames de bioensaio em camundongos, soroneutralização e microfixação de complemento empregados para o diagnóstico de botulismo nas vacas de corte naturalmente acometidas pelo decúbito permanente, no Estado de São Paulo

	Bioensaio	Soroneutralização		Microfixação			
		C[a]	D[a]		C	D	CD[a]
Positivos	15 (53,6%)	3	1	26 (92,9%)	10	6	10
Negativos	13 (46,4%)			02 (7,1%)			
Total	28			28			

[a] Tipos de toxinas botulínicas.

dos membros, parecendo lógico associar a para ou tetraparesia flácidas (Fig. 15, 18 e 19) à causa do decúbito permanente. Quanto ao tônus da língua, na maior parte dos casos este se encontrava diminuído ou ausente (Fig. 16 e 19), não aparentando, entretanto, ser esta potencial disfagia, a principal causa da ausência de ingestão de alimentos pelos animais, uma vez que os mesmos não demonstravam real interesse em fazê-lo. Por fim, em contraste com a impotência funcional motora acima caracterizada, foram raras as evidências de anormalidades na função sensorial, avaliada pela presença de sensibilidade cutânea paravertebral e nos membros (Fig. 17).

A caracterização do conjunto de sintomas considerada anteriormente é coerente com as citações de Döbereiner et al. (1990, 1992), Dutra (1991) e Real et al. (1991), e encontra forte compatibilidade com as descrições dos quadros clínicos de intoxicação botulínica em bovinos, na literatura consultada (Henning 1949, Tokarnia et al. 1970, Blood & Radostits 1989, Mayhew 1989), nos quais a toxina por sua suposta ação a nível de junções neuromusculares, é capaz de determinar a paralisia funcional motora sem interferência com a função sensorial.

Diagnóstico de botulismo

A apreciação do Quadro 2 permite verificar que o diagnóstico clínico de botulismo foi confirmado em aproximadamente metade das vacas estudadas por meio do ensaio biológico em camundongos, sendo que quase a totalidade resultou positiva quando da realização do teste de microfixação de complemento.

A diferença observada entre os resultados dos dois métodos empregados possui semelhança com os relatos de Weiss & Weiss (1988) e Dutra et al. (1993), refletindo possivelmente a limitação do ensaio biológico em termos de sensibilidade, e reafirmando a superioridade da microfixação neste aspecto.

Apesar desta limitação, a inoculação em camundongos foi capaz de detectar um número relativamente elevado de animais positivos quando comparado às citações de Dutra et al. (1993) e Ortolani (1993), devendo-se salientar, no entanto, que ao contrário do fígado, as amostras de soro sanguíneo ou conteúdo digestivo, as quais constituem-se no material comumente enviado ao laboratório para esta análise, podem não conter quantidades suficientes de toxina.

As provas de soroneutralização, embora em número muito reduzido, e de microfixação de complemento permitiram, por sua vez, a detecção da presença das toxinas botulínicas dos tipos C e/ou D nas diferentes amostras de

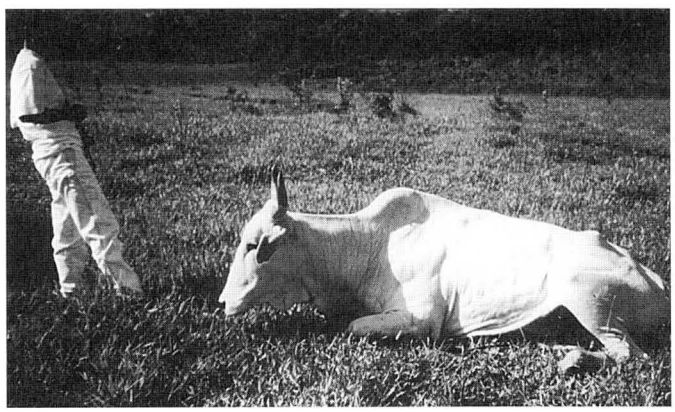


Fig. 18. Vaca acometida pelo botulismo, apresentando decúbito esternal permanente há 36 horas, e resposta absolutamente normal aos estímulos do meio (alerta).

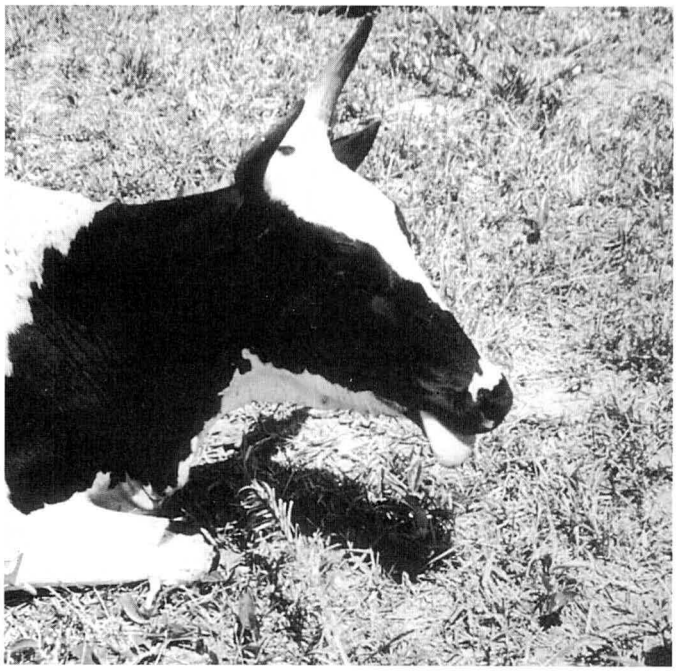


Fig. 19. Vaca acometida pelo botulismo com decúbito esternal permanente há 24 horas, apresentando-se alerta e com ausência do tônus da língua.

fígado testadas, o que encontra coerência com as indicações de Henning (1949) e Blood & Radostits (1989) a respeito da relativa especificidade entre estes tipos de toxina e a espécie bovina, estando de acordo ainda com os achados de Tokarnia et al. (1970) e Dutra et al. (1993) em animais naturalmente acometidos no Brasil. A presença concomitante de ambos os tipos de toxina acusada em uma proporção considerável do material, à semelhança dos relatos de Dutra et al. (1993), pode ser interpretada como reação cruzada em consequência da semelhança antigênica entre os tipos C e D de toxina botulínica.

Merece consideração final o fato de que somente dez (31,2%) vacas incluídas no estudo apresentassem fragmentos de ossos no interior do retículo e/ou rúmem confirmando a depravação do apetite, a qual, representa o principal risco de intoxicação. Tal aparente contradição guarda, entretanto, coincidência relativa com os achados de Tokarnia et al. (1970), e pode ser justificada pelas colocações de Henning (1949) de que bovinos deficientes em fósforo, adquirem o hábito de roer e mascar ossos, sem necessariamente degluti-los, arriscando-se a ingerirem a toxina letal de *Clostridium botulinum*.

CONCLUSÕES

Nas condições em que se desenvolveu o presente estudo, a análise do conjunto de resultados permitiu as seguintes conclusões:

1. Do ponto de vista epidemiológico, o problema se verificou em rebanhos de corte, explorados extensivamente, com manejos de suplementação mineral e sanitário não adequados, sendo a maior ocorrência de dezembro a março, e acometendo principalmente as vacas, em especial as prenhes e lactantes, com coeficientes de morbidade e mortalidade idênticos e relativamente reduzidos.

2. O conjunto de sintomas caracterizou-se por funções vitais normais à exceção de hipotonia ruminal, anorexia com desidratação, paraparesia ou tetraparesia flácidas com decúbito permanente, e diminuição ou ausência do tônus da língua, sem alterações quanto ao estado mental, visão, audição e sensibilidade cutânea.

3. A confirmação do diagnóstico de intoxicação com os tipos C e D de toxina botulínica nos bovinos estudados, encontra coerência com os achados epidemiológicos e clínicos, demonstrando ser o botulismo epizoótico a causa da mortalidade investigada na área de abrangência do estudo.

Agradecimentos.- Aos médicos veterinários residentes José Thomáz Manso Saião, Martha Luzia Pacheco, Alexandre Secorun Borges e Francisco César de Moura e Silva pela colaboração na fase de colheita de dados. À Profª Drª Maria Cecília Rui Luvizotto pela participação e o acompanhamento nas fases de idealização e inicial do trabalho. Ao Dr. Jürgen Döbereiner pela interferência junto ao "Staatens Serum Institut" de Copenhagen, Dinamarca, possibilitando a cessão de antitoxinas botulínicas.

REFERÊNCIAS

Berquó E.S., Souza J.P.M. & Gotlieb L.D. 1980. Bioestatística. EPU, São Paulo. 325p.

Blood D.C. & Radostits O.M. 1989. Veterinary Medicine. 7th ed. Baillière Tindall, London. 1502p.

Dirksen G., Gründer H.D. & Stöber M. 1993. Rosenberger - Exame Clínico dos Bovinos. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 419p.

Döbereiner J., Langenegger J., Tokarnia C.H. & Dutra I.S. 1990. Botulismo epizoótico dos bovinos no Brasil. Anais 16º Congr. Mundial de Buiatria, Salvador, p. 540-546.

Döbereiner J., Tokarnia C.H., Langenegger J. & Dutra I.S. 1992. Epizootic botulism of cattle in Brazil. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 99:188-190.

Dutra I.S. 1991. Botulismo em bovinos, "Doença da Vaca Caída". FUNEP, Jaboticabal. 12p.

Dutra I.S., Weiss H.E., Weiss H. & Döbereiner J. 1993. Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. Pesq. Vet. Bras. 13:83-86.

Henning M.W. 1949. Animal Diseases in South Africa. 2nd ed. Central News Agency, South Africa, p. 324-353.

Mayhew I.G. 1989. Large Animal Neurology. Lea & Febiger, Philadelphia. 380p.

Ortolani E.L. 1993. Panorama epidemiológico da mortalidade enzoótica de bovinos adultos no Brasil e no Paraguai: retrospectiva e levantamentos. Hora Vet. 71:20-24.

Real C.M., Real M.R. & Real M.R. 1991. Etiologia da mortandade de vacas em Mato Grosso do Sul, Brasil. Hora Vet. 63:39-53.

Tokarnia C.H., Langenegger J., Langenegger C.H. & Carvalho E.V. 1970. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. Pesq. Agropec. Bras. 5:465-472.

Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Moraes S.S. 1988. Situação atual e perspectivas sobre nutrição mineral em bovinos no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 8(1/2):1-16.

Weiss H.E. & Weiss H. 1988. Nachweis von *Clostridium botulinum*-Toxin mittels Mikro-Wärmekomplementbindungsreaktion. Tierärztl. Umschau 43:117-126.

Pesq. Vet. Bras. 16(2/3):75-79, abr./set. 1996

BRUCELOSE OVINA NO RIO GRANDE DO SUL[1]

Albino Magalhães Neto[2] e Carlos Gil-Turnes[3]

ABSTRACT.- Magalhães Neto A. & Gil-Turnes C. 1996. **[Brucella ovis infection of sheep in Rio Grande do Sul, Brazil.]** Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária 16 (2/3):75-79.* Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

Sera from 1536 rams and 102 teasers belonging to 76 herds in Rio Grande do Sul, Brazil, were tested by the immunodiffusion test for detection of *Brucella ovis* antibodies. Spermiograms of 20 serologically negative, 16 serologically positive and 13 serologically and clinically positive rams were also performed. Antibodies were detected in 13.4% of the animals and clinical manifestations in 9.8%. Rams and teasers maintained on the field showed lower prevalences (12.6 and 11.7%) than confined rams (17.7%). Semen of negative rams showed higher percentage of normal spermatozoids (91%) than those of serologically positive (70%) and serologically and clinically positive (50%) ones. Herds using artificial insemination showed slightly higher prevalence (15.3%) than those using natural mating (12%). Serologically positive animals were detected in 48% of the herds using artificial insemination and in 46% of those using natural mating. It is concluded that *B. ovis* infection is still a threat for sheep breeding in this state.

INDEX TERMS: Ovine brucellosis, *Brucella ovis* infection.

SINOPSE.- Os soros de 1536 carneiros e 102 rufiões pertencentes a 76 rebanhos do Rio Grande do Sul foram submetidos ao teste de imunodifusão para detecção de anticorpos contra *Brucella ovis*. Realizaram-se, também, espermiogramas de 20 carneiros negativos, 16 sorologicamente positivos e 13 clínica e sorologicamente positivos. Detectaram-se anticorpos em 13,4% e manifestações clínicas em 9,8% dos animais. Tanto os carneiros quanto os rufiões mantidos em condições de campo apresentaram prevalências menores (12,6 e 11,7%) que os carneiros de cabanha (17,7%). O sêmen de carneiros negativos apresentou maior porcentagem de espermatozóides normais (90%) que o de reagentes sorológicos (70%) e o de animais sorológica e clinicamente positivos (50%). As prevalências em rebanhos que usavam inseminação artificial e monta natural foram 15,3% e 12% e a de rebanhos com reagentes 48% e 46%, respectivamente. Conclui-se que a infecção por *B. ovis* continua sendo uma importante causa de perdas econômicas na ovinocultura regional.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Brucelose ovina, infecção por *Brucella ovis*.

INTRODUÇÃO

A brucelose ovina causada por *Brucella ovis*, também denominada epididimite dos carneiros, é uma doença própria dos ovinos e caprinos caracterizada por epididimite nos machos, aborto nas fêmeas e mortalidade perinatal de cordeiros, que diminuem a eficiência reprodutiva dos rebanhos provocando elevadas perdas econômicas à ovinocultura. Desde sua descrição na Nova Zelândia por Buddle & Boyes (1953) tem sido diagnosticada em praticamente todos os países onde se criam ovinos, com a exceção da Grã-Bretanha (Burgess 1982). No Rio Grande do Sul foi comunicada pela primeira vez pelos pesquisadores do Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Sul, com sede em Pelotas (Fernandes et al. 1996), que detectaram epididimites em 6,5% de 3317 carneiros estudados neste estado (Ramos et al.1996). Blobel et al.(1972) produziram epididimite em carneiros com uma bactéria similar a *Brucella* isolada de dois carneiros de municípios da fronteira com o Uruguai e que apresentavam epididimite clínica.

O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de infecções por *Brucella ovis* entre carneiros pertencen-

[1]Aceito para publicação em 23 de maio de 1996.

[2]Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul; bolsista CNPq (824129/89-0).

[3]Centro de Biotecnologia, UFPel; bolsista CNPq (824129/89-0).

tes a rebanhos ovinos do Rio Grande do Sul, duas décadas após a primeira descrição de casos da doença na região.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. Coletaram-se amostras de sangue de 1638 machos ovinos, dos quais 1536 carneiros e 102 rufiões de diferentes raças pertencentes a 76 estabelecimentos de cria de vinte municípios do Rio Grande do Sul. Destes 1271 estavam a campo, 265 em regime de cabanha e 102 eram rufiões a campo. A distribuição dos animais testados por município foi a seguinte: Santa Vitória do Palmar 15, Rio Grande 104, Pelotas 8, São Lourenço do Sul 5, Pedro Osório 215, Herval do Sul 336, Jaguarão 27, Pinheiro Machado 201, Bagé 12, Dom Pedrito 2, Livramento 22, Quaraí 37, Uruguaiana 124, Caçapava do Sul 2, Piratini 45, Encruzlhada do Sul 1, Canguçú 7, Pantano Grande 1, Passo Fundo 2 e Salvador do Sul 30. Testaram-se também soros de 442 carneiros comercializados no estado e exportados para o Uruguai, cuja origem não foi informada. Os animais foram submetidos a exame clínico, visando detectar anomalias ou lesões dos órgãos genitais (Alton et al. 1976).

Sorologia. Os soros foram submetidos à prova de imunodifusão em gel utilizando antígeno termoextraído de *Brucella ovis* CPZ 11 (cedida pelo Centro Panamericano de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina) obtido segundo a metodologia de Alton et al. (1976).

Sêmen. Coletou-se sêmen de 49 carneiros, sendo 20 sorologicamente negativos e sem manifestações clínicas de epididimite, 16 sorologicamente positivos e 13 clínica e sorologicamente positivos. As amostras foram obtidas por eletroejaculação ou vagina artificial, conservadas em salina formolada e coradas de Williams (1920). Observaram-se ao microscópio 200 espermatozóides por amostra, sendo classificados como normais, cabeça isolada, com defeitos de cabeça, de cauda e outros defeitos.

RESULTADOS

Apresentaram sorologia positiva 26 dos 448 carneiros de um ano de idade, 88 dos 649 de dois anos, 41 de 274 de três anos e 65 de 267 de quatro anos ou mais. Ao exame clínico apresentaram lesões 23, 47, 38 e 52 de cada grupo (Fig 1).

O número de machos das diferentes raças testados e a prevalência encontrada em cada uma comunica-se no Quadro 1.

De 1271 carneiros a campo, 265 mantidos em regime de cabanha e 102 rufiões testados, 161 (12,6%), 47 (17,7%) e 12(11,7), respectivamente, foram sorologicamente positivos (Fig 2).

As prevalências de reatores sorológicos e rebanhos com infecção em estabelecimentos que utilizavam inseminação artificial e monta natural comunica-se nos Quadros 2 e 3.

Os espermiogramas demonstraram que no grupo sorologicamente negativo 91% dos espermatozóides eram normais, 3% apresentavam cabeça isolada, 2% defeitos de cabeça, 3% de cauda e 1% outros defeitos. No grupo sorologicamente positivo 70% dos espermatozóides eram normais, 10% com cabeças isoladas, 4% com defeitos de cabeça, 10% de cauda e 6% com outros defeitos. No grupo sorológica e clinicamente positivo 50% dos espermatozóides eram normais, 25% apresentaram cabeças isoladas, 4%

Quadro 1. Prevalência de reatores sorológicos a *Brucella ovis* por raça em 1638 machos ovinos, amostrados de 1988 a 1994 em estabelecimentos do Rio Grande do Sul

Raça	Positivos/Testados	Prevalência	Estabelecimentos
Corriedale	77/835	9.2	33
Ideal	45/353	12.7	21
Merino	37/186	19.9	5
R. Marsh	42/162	25.9	4
H. Down	7/31	22.6	4
Karakul	2/29	6.9	2
Suffolk	6/21	28.6	9
Ile de France	2/16	12.5	6
Texel	2/4	50	2
Border Leicester	0/1	0	1

Quadro 2. Prevalência de reatores sorológicos a *Brucella ovis* em carneiros provenientes de estabecimentos que utilizam inseminação artificial ou monta natural

Ano	Carneiros			
	Inseminação artificial		Monta natural	
	+/T[a]	%	+/T	%
1988	5/133	3,7	0/28	0
1989	12/120	10	32/127	25,2
1990	6/100	6	20/130	15,4
1991	1/9	11,1	8/70	11,4
1992	46/152	30,3	17/183	9,3
1993	2/9	22,2	35/393	9
1994	36/183	19,7	0/1	0
Totais	108/706	15,3	112/932	12

[a] + = reatores sorológicos, T = animais amostrados.

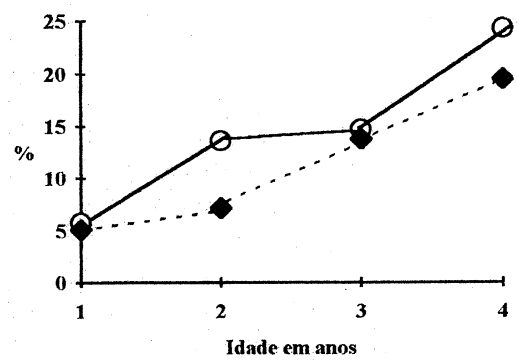


Fig 1. Prevalência por grupo etário de machos ovinos soropositivos a *Brucella ovis* (◆) e com manifestações clínicas (O) entre 1638 testados em estabelecimentos do Rio Grande do Sul de 1988 a 1994.

Quadro 3. Presença de infecção por *Brucella ovis* em estabecimentos que utilizam inseminação artificial ou monta natural

Ano	Estabelecimentos			
	Inseminação artificial		Monta natural	
	+/E[a]	%	+/E	%
1988	3/7	43	0/3	0
1989	7/12	58	7/9	78
1990	2/15	13	6/19	32
1991	1/2	50	3/7	43
1992	6/7	86	6/11	55
1993	2/4	50	6/11	55
1994	3/3	100	0/1	0
Totais	24/50	48	28/61	46

[a] + = estabelecimentos com reatores, E= estabecimentos amostrados.

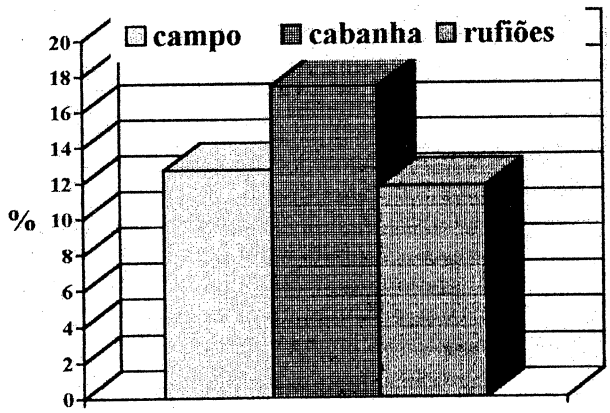


Fig 2. Prevalência de infecções por *Brucella ovis* em carneiros de campo, de cabanha e rufiões.

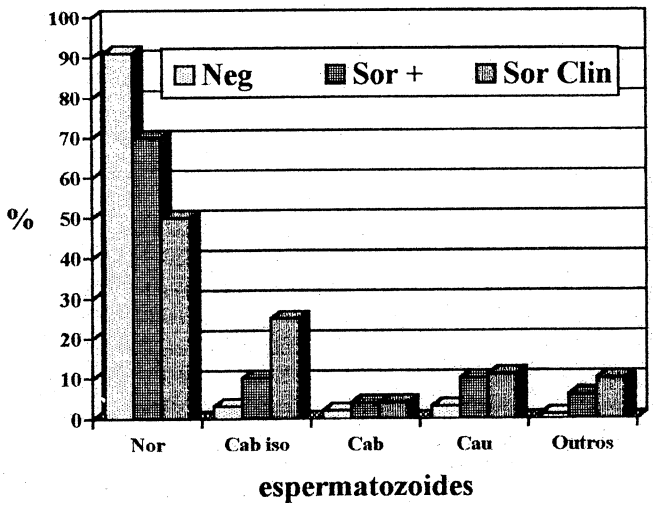


Fig 3. Espermatozóides normais, com cabeça isolada, defeitos de cabeça, defeitos de cauda e outros defeitos em carneiros negativos a *Brucella ovis*, sorologicamente positivos e clínica e sorologicamente positivos.

defeitos de cabeça, 11% de cauda e 10% outros defeitos (Fig. 3).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram que não tem havido progressos significativos no controle da brucelose ovina no Rio Grande do Sul nos últimos 25 anos podendo concluir-se que as medidas de controle ou não foram eficientes ou não foram atendidas pelos produtores. A Instrução de Serviço Nº 07/78 do Ministério da Agricultura que normatiza os requisitos sanitários mínimos a serem estabelecidos para participação de animais em exposições, feiras e outras aglomerações, exige para ovinos e caprinos atestado de exame negativo à soroaglutinação contra a brucelose, tanto pela técnica rápida ou lenta ou pelo card test (Ministério da Agricultura 1978), técnicas que não detectam animais infectados por *Brucella ovis* (Suarez et al. 1988).

Fernandes et al. (1966) detectaram mediante a técnica de fixação do complemento que 9,5% de 1338 carneiros eram soropositivos a uma bactéria similar à brucela e que 18,6% apresentavam anomalias do aparelho genital que poderiam interferir na reprodução, enquanto Ramos et al. (1966) encontraram que 7,3% de 3317 carneiros estudados no estado apresentavam epididimite clínica. Estes índices são inferiores aos determinados em nosso trabalho no qual comprovou-se que dos 1638 ovinos machos estudados 13,5% tinham anticorpos contra *B. ovis* e 9.8% apresentavam manifestações clínicas de epididimite. Estas diferenças, que podem dever-se aos métodos de diagnóstico sorológico utilizados e à subjetividade do método clínico de avaliação, demostram que a doença em lugar de haver diminuído estaria aumentando no rebanho ovino do Estado.

A distribuição geográfica da doença também parece não ter sofrido modificações. Ramos et al. (1966) detectaram epididimite em 14 dos 15 municípios por eles estudados, não encontrando doentes entre 128 carneiros pertecentes a três estabelecimentos de Uruguaiana. Em nosso trabalho a doença foi diagnosticada em 11 de 12 municípios estudados anteriormente por eles, assim como em outros cinco, não sendo detectados reatores em Dom Pedrito, Passo Fundo, Encruzilhada do Sul e Pantano Grande, em cada um dos quais estudou-se somente um estabelecimento com reduzido numero de animais.

Ramos et al. (1966) encontraram a mais alta prevalência em animais da raça Romney Marsh (11,2%), enquanto em nosso trabalho ela foi detectada em animais da raça Suffolk (28,6%), raça que eles não testaram, seguida pela Romney Marsh com 25,9%. Estas diferenças podem se dever à metodologia de diagnóstico empregada, a imunodifusão em nosso trabalho e o exame clínico no de Ramos et al. (1966). Infecções subclínicas são responsáveis pelas maiores taxas dos diagnósticos sorológicos com relação aos clínicos.

Brucella ovis não é, porém a única causa de epididimite, havendo sido detectada em 79,5% dos carneiros maiores

de 2 anos com lesões epididimais enquanto *Histophilus ovis* e *Actinobacillus seminis* foram a causa mais frequente em animais de menor idade (Walker et al. 1986). Para estudar a possibilidade de infecções por *Actinobacillus seminis*, que podem dar reações cruzadas com *B. ovis* (Hajktos et al. 1987), os soros de 44 carneiros que apresentavam epididimite clínica, 37 dos quais eram reatores a *B. ovis*, assim como outros 269, todos eles do Estado, foram testados pela técnica de imunodifusão com antígeno de *A. seminis*, sendo todos negativos (Rosa et al. 1994). A influência da idade na prevalência da doença foi também evidenciada em nosso trabalho, sendo demonstrado que as prevalências sorológica e de manifestações clínicas eram 4 vezes maiores nos animais com mais de 4 anos que a registrada no grupo de um ano de idade.

A prevalência da infecção foi levemente mais alta no grupo de carneiros utilizados em inseminação artificial que nos utilizados em monta natural, assim como nos mantidos em regime de cabanha que nos mantidos à campo, o que poderia ser devido a fatores de manejo, tais como concentração em espaços reduzidos e à possibilidade de transporte mecânico do agente pelo tratador. Mesmo assim, é necessário considerar que a taxa dos estabelecimentos que utilizavam inseminação artificial foi diferenciada por dois estabelecimentos estudados em 1994, com índices de 25 e 15%, e por outro em 1992, com 28,2%, indicando que deve ser considerada com reservas devido à influência que nela podem ter tido estabelecimentos problema.

Merece também destacar-se, mesmo sendo pequeno o número de amostras estudadas, que houve um incremento de espermatozóides com defeitos principalmente de cauda e cabeças isoladas, nos animais soropositivos com relação ao grupo controle, o que poderia explicar a diminuição da fertilidade que caracteriza a doença. Estas observações concordam com as de Kimberling (1990) e de Cameron at al. (1971) que consideraram a infecção por *B. ovis* como a mais importante causa de aspermia em carneiros sem manifestações clinicamente detectáveis, sendo cabeças isoladas e defeitos de cauda as alterações espermáticas mais frequentes.

A brucelose ovina tem na região, como pode comprovar-se pelas taxas detectadas em estabelecimentos que utilizavam monta natural (46%) e inseminação artificial (48%), uma disseminação tão importante quanto a verificada no Uruguai onde a metade dos estabelecimentos criadores de ovinos tem a infecção (Bermúdez et al. 1986). A informação sobre a importância da doença em outros estados é muito escassa. Marinho (1994) testou 850 soros de ovnos pertencentes a 18 rebanhos de 15 municípios do estado de São Paulo mediante as técnicas de imunodifusão e de fixação do complemento, sendo todos negativos. Estas comprovações salientam a importância de estabelecer rotinas de detecção da doença nos reprodutores comercializados no Estado.

Os resultados do presente trabalho demonstram que a brucelose ovina continua sendo uma doença de expressiva importância, em cujo controle não tem havido progresso desde que foi diagnosticada no Estado. Devido a que *B. ovis* pode provocar infecções subclínicas recomenda-se para considerar um animal como negativo que além do exame clínico seja realizado um exame sorológico (fixação do complemento, imunodifusão, ELISA) e/ou o exame bacteriológico de sêmen. A imunodifusão em gel com antígeno termoextraído, considerada de alta sensibilidade e especificidade (Hilbink et al. 1993), é um teste de fácil execução pelos veterinários com recursos limitados de laboratório que permitiria a detecção de portadores antes de seu ingresso na reprodução, medida de controle essencial que tem demonstrado sua eficácia no controle da doença (Burgess 1952).

Agradecimentos.- Os autores agradecem a participação dos bolsistas do CNPq Osmar Dacroce (IC-806059/89-3), Flávia W. Da Cruz (IC-806059/89-3), Andrea Freitas Dos Santos (AP-824129/89), dos Médicos Veterinários J. Ferreira e S. R. Martins e da Laboratorista Alegani Monteiro, assim como o apoio financeiro da FAPERGS (Proc.0835/89).

REFERÊNCIAS

Alton G.G., Jones L.M. & Pietz D.E 1976. Las técnicas de laboratorios en la brucelosis. 2ª ed. Organização Mundial de la Salud, Ginebra.

Bermúdez J., Olivera M., Bañalez P., Leániz R. & Cobo A.H. 1986. Epididimitis a *Brucella ovis*. Boletin Técnico, Laboratórios Santa Elena Montevideo, Uruguay. 9p.

Blobel H., Fernandes J.C.T., Mies Filho A.A. & Trein E.J. 1972. Estudos sobre a etiologia da epididimite ovina no Rio Grande do Sul. Pesq. Agropec. Bras. 7:1-4.

Buddle M.B. & Boyes B.W. 1953. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. Aust. Vet. J. 29:145-159.

Burgess G.W 1982. Ovine contagious epididymitis: a review. Vet. Microbiol. 7:551-575.

Cameron R.D.A.A., Carles A.B. & Lauerman Jr. L.H. 1971. The incidence of *Brucella ovis* in some Kenya flocks and its relationship to clinical lesions and semen quality. Vet. Rec. 88:552-557.

Fernandes J.C.T., Louzada C.R.R., Silva M. & Schenck J.A.P. 1966-67. Levantamento sorológico parcial da epididimite ovina no Rio Grande do Sul. Anais SOVERGS, Porto Alegre, p. 16.

Gamazo C., Winter A.J., Moriyón I., Riezu-Boj J.I., Blasco J.M. & Diaz R. 1989. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. Infect. Immunol. 57:1419-1426.

Hajktós I., Fodor R., Glávits R. & Varga J. 1987. Isolation and characterization of *Actinobacillus seminis* strains from ovine semen samples and epididymitis. J. Vet. Med. B34:138-147.

Hilbink F., Wright M. & Ross G. 1993. Use of the double gel diffusion test and the enzyme-linked immunosorbent assay to distinguish false from true reactors in the complement fixation test for *Brucella ovis*. N. Z. Vet. J. 41:111-115.

Kimberling C.V. & Marsh D. 1994. Ram breeding soundness evaluation. Proc. Small Ruminant Short Course, Am. Coll. Theriogenologists and Society for Theriogenology, Hastings, NE, USA, p. 55-71.

Marinho M. 1994. Estudo sorológico sobre a brucelose em ovinos do Estado de São Paulo. Tese de Mestrado, Unesp, Jaboticabal, S. Paulo. 64 p.

Ministério da Agricultura 1978. Instrução de Serviço Nº 07/78, Divisão de Defesa Sanitária Animal, Departamento Nacional de Produção Animal, Brasilia, 23 de janeiro.

Ramos A.A., Mies Filho A., Schenck J.A.P., Vasconcellos L.D., Prado O.T., Fernandes J.C.T. & Blobel H. 1966. Epididimite ovina. Levantamento clínico no Rio Grande do Sul. Pesq. Agropec. Bras. 1:211-213.

Rosa C.M., Zorttea D., Da Cruz F. & Gil-Turnes C. 1994. Levantamento sorológico de infecções por *Actinobacillus seminis* em carneiros. In: Anais XII Congr. Est. Med. Vet., SOVERGS, Porto Alegre, p. 38.

Suarez C.E., Pacheco G.A. & Vigliocco A.M. 1988. Characterization of *Brucella ovis* surface antigens. Vet. Microbiol. 18:349-356.

Walker R.L., LeaMaster B.R., Stellflug J.N. & Biberstein E.L. 1986. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. J. Am. Vet. Med. Assoc. 188:393-399.

Williams W.W. 1920. Technique of collecting semen for laboratory examination with a review of sereval diseased bulls. Cornell Vet. 10:87-94.

Pesq. Vet. Bras. 16(2/3):81-86, abr./set. 1996

ULTRA-ESTRUTURA DAS ALTERAÇÕES ÓSSEAS NA INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Solanum malacoxylon* EM COELHOS[1]

Severo Sales de Barros[2], Denise Russowski[3] e Silvia M. Grando[3]

ABSTRACT.- Barros S.S., Russowski D. & Grando S.M. 1996. [**Ultrastructural alterations of bone cells in the experimental Solanum malacoxylon poisoning in rabbits.**] Ultra-estrutura das alterações ósseas na intoxicação experimental por Solanum malacoxylon em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira 16(2/3):81-86.* Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97119-900 Santa Maria, RS, Brazil.

The ultrastructure of bone cells of mid-diaphysis of the humerus of young rabbits that received by gastric tube a water estract of *Solanum malacoxylon* corresponding to 100 mg/kg of body weight is described. Atrophic, degenerated and necrotic osteocytes and mineralization of perilacunar osteoid were the main lesions. Osteoblasts were atrophic with diminution of synthetic organels.

Osteoclasts exhibited a ruffle border in close contact with the non eroded mineralized matrix, poorly developed vesicular region and absent clear zone. Macrophages in fusion forming multinucleated giant cells were seen in some resorption cavities. It is suggested that the $1,25(OH)_2D_3$ present in the plant is responsible for the cell changes, inhibition of osteoclastic and osteocytic resorption and osteopetrosis.

INDEX TERMS: Bone pathology, osteocyte, osteoblast, osteoclast, ultrastructure, *Solanum malacoxylon,* calcitriol, rabbit.

SINOPSE.- É descrita a ultra-estrutura das células ósseas da cortical da diáfise do úmero de coelhos jovens que receberam, diariamente, via sonda gástrica, um extrato aquoso de *Solanum malacoxylon* correspondente a 100mg da planta seca por quilograma de peso corporal e foram sacrificados 96 horas após o início do experimento. Osteócitos mostravam diversos graus de atrofia e necrose. Lacunas osteocíticas com restos celulares ou vazias foram vistas com frequência. Mineralização do tecido osteóide perilacunar foi constantemente observada. Os osteoblastos mostravam atrofia, diminuição das organelas de síntese e, em algumas oportunidades, exibiam núcleos picnóticos e estavam livres nos canais de Havers. Os osteoclastos mostravam borda pregueada em íntimo contato com a matriz mineralizada não erodida, região vesicular pouco desenvolvida e ausência da zona clara na periferia da borda pregueada. Em alguns canais de Havers, foram identificados macrófagos em processo de fusão para formarem células gigantes. Sugere-se que a osteopetrose descrita na intoxicação por *S. malacoxylon* seja decorrente de inibição das atividades de reabsorção osteocítica e osteoblástica, por efeito direto da ação de $1,25(OH)_2D_3$.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Patologia óssea, osteócito, osteoblasto, osteoclasto, ultra-estrutura, *Solanum malacoxylon,* calcitriol, coelho.

INTRODUÇÃO

As alterações ósseas no curso das calcinoses expontâneas e experimentais, induzidas por plantas calcinogênicas, têm sido amplamente relatadas: existem opiniões conflitantes sobre os efeitos dessas plantas no tecido ósseo, e os resultados são discrepantes quanto á patogenia, havendo, no entanto corcondância em que o princípio ativo dessas plantas, o $1,25(OH)_2D_3$ é o fator determinante.

[1] Aceito para publicação em 21 de junho de 1996.

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

[2] Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97119-900 Santa Maria, RS; Bolsista pesquisador do CNPq.

[3] Departamento de Patologia, UFSM; Bolsista de apoio técnico do CNPq.

Nos relatos das alterações dos ossos nas calcinoses espontâneas e experimentais é descrita osteopetrose, com aumento da massa óssea bem mineralizada. Essa alteração é atribuída ora a maior aposição óssea (Carrillo 1973, Dämmrich et al. 1970, 1995, Norrdin et al. 1975), ora a inibição da reabsorção osteocítica (Krook et al. 1975a,b, Santos et al. 1976, Gimeno 1980, Riet-Correa et al. 1987). Frequentemente têm sido descritas degeneração e necrose dos osteócitos, sugerindo que o princípio ativo de *Solanum malacoxylon* (SM), o 1,25-diidroxicolecalciferol, pelo menos nas concentrações utilizadas, seria tóxico para essas células, resultando em diminuição da reabsorção óssea acompanhada de osteopetrose e finalmente osteonecrose (Krook et al. 1975 a,b, Santos, et al. 1976, Gimeno 1980). Atrofia e necrose de osteócitos foram também relatadas na intoxicação pela vitamina D em suínos (Haschek et al. 1977).

Apesar das excelentes descrições histológicas e histoquímicas dessas alterações ósseas, não há relato de uma análise ultra-estrutural das modificações das células ósseas no curso das calcinoses induzidas por plantas calcinogênicas. Este experimento foi programado para estudar as alterações ultra-estruturais dos osteócitos, osteoblastos e osteoclastos na intoxicação experimental por SM em coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

Quatro coelhos da raça Nova Zelândia, com aproximadamente dois meses, foram alojados em gaiolas metálicas e alimentados com ração comercial[4] e água *ad libitum*. Três deles receberam diariamente, via sonda gástrica, extrato aquoso de *Solanum malcoxylon* (SM), correspondente a 100mg da planta por quilograma de peso. Um animal não recebeu o extrato e serviu como controle.

O extrato da planta foi preparado colocando-se 20g de folhas secas e moidas em 400 ml de água destilada por 24 horas no refrigerador a 4°C. Após, a suspensão foi tamisada em gaze e estocada em refrigerador.

Os três animais que receberam o extrato foram sacrificados por sangria, com prévia narcose por eter, 96 horas após receberem a primeira dose e, na mesma oportunidade, foi também sacrificado o coelho controle. Pequenos fragmentos da cortical da diáfise do úmero de todos os animais foram fixados imediatamente após o sacrifício, em solução de glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão e incluidos em Epon. Os blocos foram cortados com navalha de diamante e os cortes foram duplamente contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão.

RESULTADOS

Os osteócitos exibiam diversos graus de atrofia e degeneração e muito deles encontravam-se necróticos. A alteração mais precoce observada foi uma dilatação do retículo endoplasmático e de forma muito acentuada da cisterna perinuclear. As mitocôndrias apareciam em pequeno número e o sistema de Golgi, na maior parte das células, era pouco evidente. Os núcleos estavam diminuídos de tamanho, com contornos irregulares e cromatina condensada. O citoplasma exibia notável diminuição de volume, adquirindo formas bizarras e liberando fragmentos recobertos por membrana os quais sofriam mineralização e foram interpretados como vesículas matriciais (Fig. 1 e 2). As alterações atróficas e degenerativas dos osteócitos foram vistas na maioria das células, incluindo osteócitos jovens próximos aos canais de Havers (Fig.3). As lacunas osteocíticas geralmente mostravam acentuada diminuição do tecido osteóide perilacunar substituido por osteoplasia caracterizada por mineralizações do osteóide na borda da lacuna. Esses depósitos minerais apareciam sob a forma granular ou cristalina, esta última de aspecto acicular ou como um emaranhado fibrilar (Janela na Fig.1). As lacunas com osteócitos atróficos ou degenerados eram preenchidas por material de aspecto finalmente flocular (Fig. 2). Algumas lacunas exibiam restos celulares em meio a material flocular, ou estavam vazias (Fig.4), com discreta quantidade de tecido osteóide perilacunar parcial ou totalmente mineralizado.

Os osteoblastos, particularmente aqueles nos canais de Havers, mostravam-se achatados, atróficos, com escassas cisternas do retículo endoplasmático, as quais geralmente estavam dilatadas. O sistema de Golgi era pouco evidente. O citoplasma exibia prolongamentos e projeções irregulares, e, em grande parte, as células perdiam o contato umas com as outras, e algumas se encontravam livres no espaço dos canais.

Em cavidades de reabsorção, puderam ser vistos osteoclastos aparentemente inativos, com borda pregueada em íntimo contato com a matriz óssea mineralizada a qual não exibia sinais de erosão (Fig.6). A zona clara, na periferia da borda pregueada, não foi observada. As mitocôndrias na região basal estavam dilatadas com matriz eletrolucida e cristas rompidas. A região vesicular estava pouco desenvolvida e constituída por pequenos vacúolos medindo entre 150nm e 1,4μm.

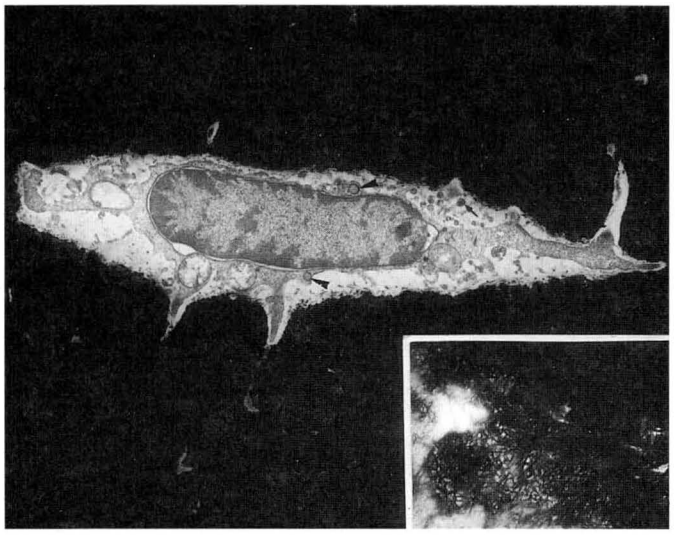
O sistema de Golgi era pouco proeminente e nem sempre observado em todas as células. No sistema de Havers, foram identificados macrófagos em processo de fusão para constituírem células gigantes multinucleadas em íntimo contato com a matriz óssea mineralizada, exibindo retículo endoplasmático pouco desenvolvido, o sistema de Golgi não evidente, numerosas mitocôndrias e alguns pequenos vacúolos (Fig.8).

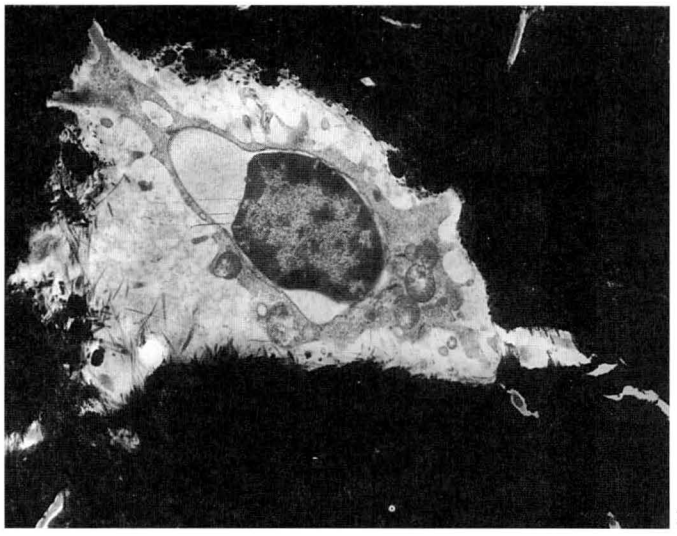
No coelho controle não foram encontradas alterações ultra-estruturais nas células ósseas.

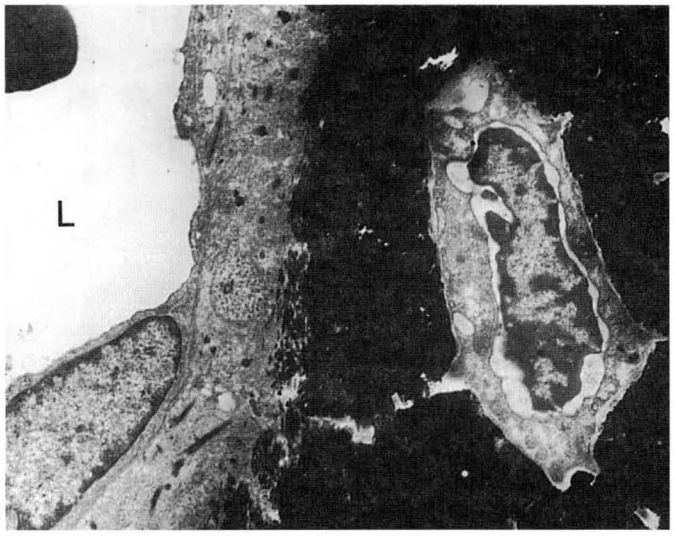
DISCUSSÃO

As alterações ultra-estruturais dos osteócitos estão de acordo com as observações em microscopia ótica que relatam degeneração e necrose dessas células nas calcinoses espontâneas e experimentais induzidas por plantas calcinogênicas (Krook et al. 1975a,b, Santos et al. 1976, Gimeno 1980, Riet-Correa et al. 1987) e na intoxicação por vitamina D_3 (Haschek et al. 1977).

[4]Ração Guabi para coelhos.







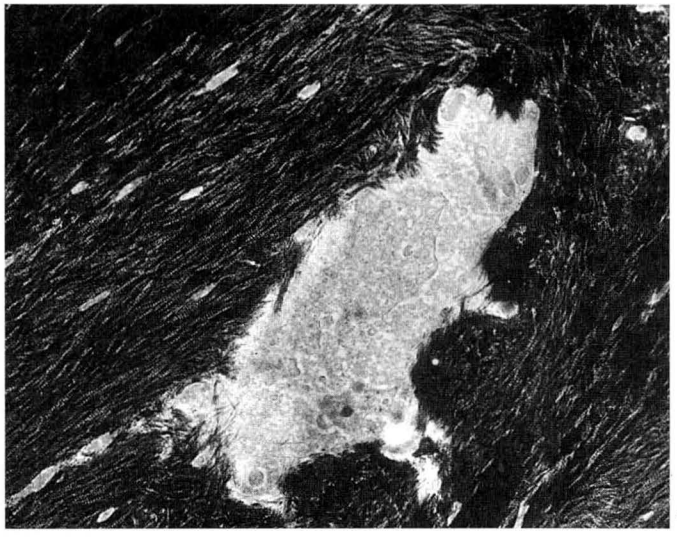


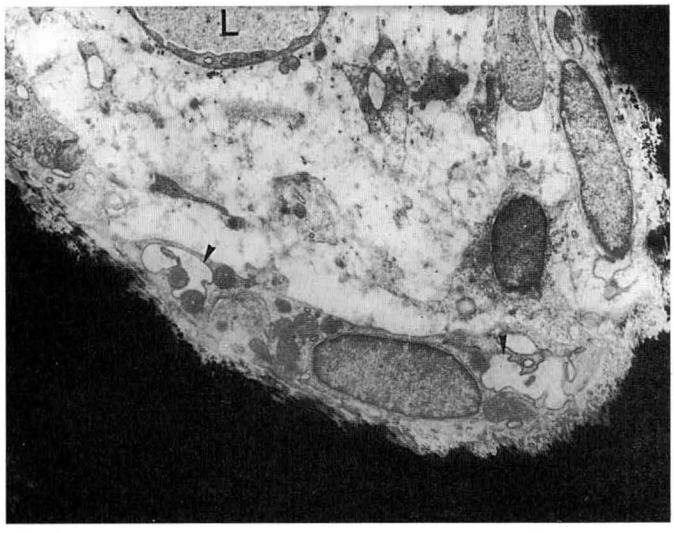
Fig. 1. Osteócito exibindo retração do citoplasma, poucos lisossomos (ponta de seta), raras cisternas do retículo endoplasmático e discreta dilatação da cisterna perinuclear. No espaço lacunar observam-se numerosos fragmentos citoplasmáticos recobertos por membrana e interpretadas como vesículas matriciais (seta). A borda da lacuna apresenta contorno irregular e mineralização do osteóide perilacunar sob a forma de agulhas ou de um emaranhado fibrilar. 56.000x.

Fig. 2. Osteócito atrófico, núcleo picnótico, dilatação acentuada da cisterna perinuclear e presença de poucos lisossomos. Espaço perinuclear aumentado mostrando matriz finamente flocular, vesículas matriciais. O osteóide perilacunar exibe mineralização, a lacuna está diminuida e a borda é irregular. 9.500x.

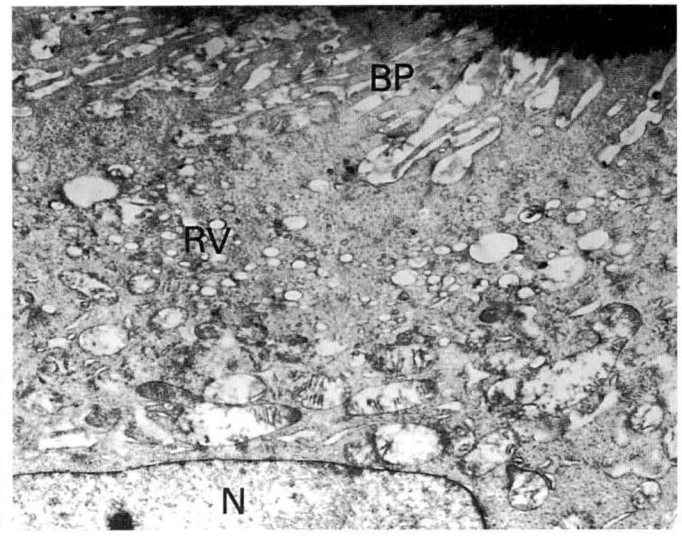
Fig. 3. Osteócito jovem próximo a canal de Havers mostrando retração do núcleo, retículo endoplasmático pouco desenvolvido e dilatação da cisterna perinuclear. A borda da lacuna aparece lisa. Lúmen do capilar (L) no canal de Havers. Note a ausência de osteoblastos junto à borda do canal. 10.080x.

Fig. 4. Lacuna osteocítica com restos necróticos mergulhados em matriz finamente flocular. 9.500x.

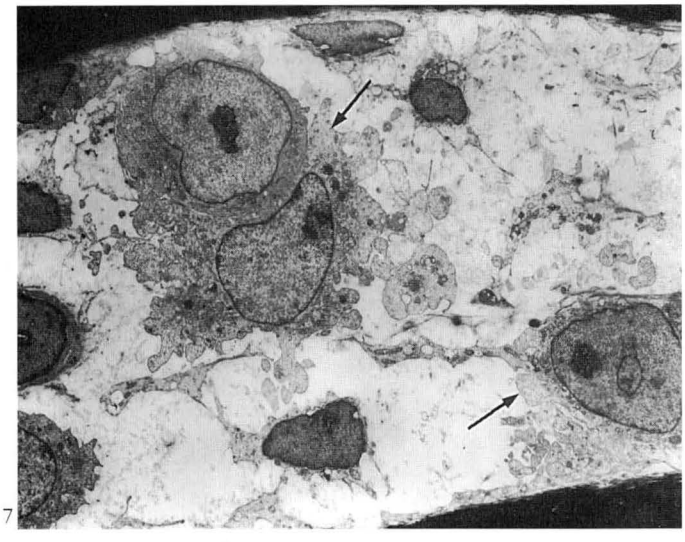
Alterações dos osteócitos e deposição de minerais nas margens da parede lacunar foram descritas após uma injeção de calcitonina (Talmage et al. 1975, Baud & Boivin 1978). Dessa forma, a curto prazo, a calcitonina causa um decréscimo no tamanho da lacuna periosteocítica. A administração de calcitonina diminui o número de osteoclastos e os transforma em um estágio de inatividade (Lucht 1980) como o observado no nosso trabalho. O hipercalcitoninismo foi considerado a causa de osteopetrose em cavalos intoxicados pela planta



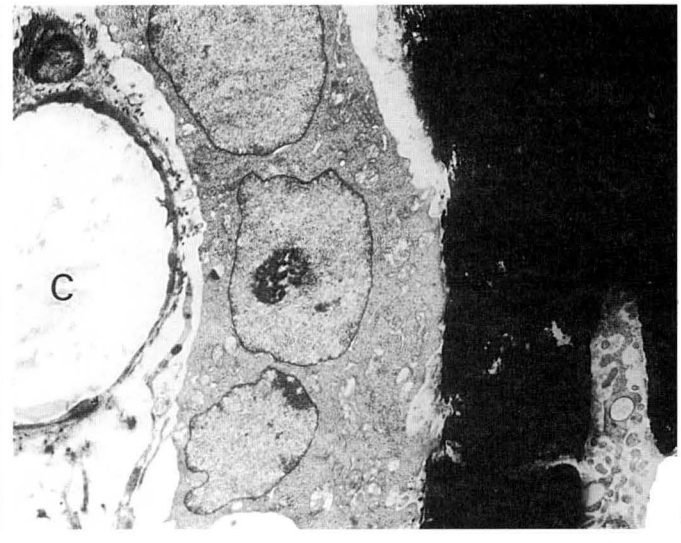
5



6



7



8

Fig. 5. Osteoblastos atróficos em canal de Havers, exibindo retículo endoplasmático pouco desenvolvido e dilatado (ponta de seta). Algumas células estão livres no espaço do canal. Capilar (L). 6.930x.

Fig. 6. Osteoclasto em cavidade de reabsorção mostrando borda pregueada (BP) em íntimo contato com matriz óssea mineralizada não erodida. Região vesicular (RV) pouco desenvolvida e vesiculas pequenas. Núcleo (N). 8.500x.

Fig. 7. Macrófagos (seta) em fusão para formar célula gigante multinucleada em cavidade de reabsorção. 2.880x.

Fig. 8. Célula gigante multinucleada no sistema de Havers. No canto inferior direito, lacuna osteocítica com processos citoplasmáticos de um osteócito atrófico. Capilar(C). 6.500x.

calcinogênica *Cestrum diurnum* (Krook et al. 1975). Esse mecanismo poderia estar envolvido na osteoplasia observada nos nossos casos, mas Santos et al. (1976) não encontraram hipercalcemia em coelhos que receberam altas doses de SM, o que parece indicar que não houve hipercalcitoninismo. Haschek et al. (1978), estudando o efeito tóxico da vitamina D em suínos, sugerem que o efeito negativo inicial sobre os osteócitos, condrócitos e osteoblastos deve ser atribuído ao efeito tóxico direto de um excesso de vitamina D_3 alimentar, pois o hipercalcitoninismo que ocorre secundariamente à hipercalcemia não seria suficiente para o rápido aparecimento deste efeito, nem é conhecido como causa de morte osteocitária. Por outro lado, não foi verificada a atividade de nucleação de cristais de apatita nas mitocôndrias dos osteócitos, como as descritas por Zichner (1970) em ratos em crescimento submetidos a injeções repetidas de calcitonina.

Gimeno (1980), estudando ossos de ratos carentes de vitamina D e intoxicados por SM, encontrou um efeito possitivo inicial na atividade osteocitária, seguida, após duas semanas, de necrose da grande maioria dessas células e decréscimo na osteólise osteocítica. Nos nossos casos, as alterações dos osteócitos, aparentemente induzidas pelo $1,25(OH)_2D_3$ contido na planta, associadas à liberação de vesículas matriciais e à inibição da reabsorção osteocítica, como tem sido frequentemente sugerido (Krook et al. 1975a,

Santos et al. 1976, Haschek et al. 1978, Riet-Correa et al. 1987), são responsáveis pela mineralização do osteóide perilacunar. Embora a ação osteolítica dos osteócitos não tenha aceitação geral (Cormack 1991), existem evidências de que osteócitos maduros são capazes de reabsorver substância mineral (Baylink et al. 1973) assim como matriz orgânica de suas áreas pericelulares e podem também formar novas camadas de matriz calcificada nas paredes de suas lacunas (Baud 1968, 1978, Jande 1970).

Os osteoblastos exibiam sinais de diminuição da sua atividade sintética, traduzida por células atróficas, achatadas, citoplasma relativamente escasso e retículo endoplasmático pouco desenvolvido parcialmente dilatado. Essa inatividade osteoblástica já foi mencionada na intoxicação experimental em coelhos por plantas calcinogênicas (Santos et al. 1976) e na intoxicação de suínos por vitamina D (Haschek et al. 1978).

Os osteoclastos mostravam borda pregueada em intimo contato com matriz óssea mineralizada não erodida, região vesicular exibindo vesículas pequenas e região basal com mitocôndrias tumefeitas, cristas rompidas e raras cisternas do retículo endoplasmático rugoso. O complexo de Golgi, tão abundante na região perinuclear de osteoclastos ativos, não foi um achado constante, e a zona clara que normalmente é encontrada na periferia da borda pregueada, não foi observada.

Células gigantes multinucleadas inativas, sem borda pregueada e sem zona vesicular foram vistas no sistema de Havers. Essa aparente inatividade osteoclástica não está de acordo com as observações de que o $1,25(OH)_2D_3$ é capaz de aumentar a reabsorção óssea osteoclástica tanto pelo incremento no número de células como de sua atividade (Grise et al. 1990). Essa discrepância poderia ser consequência das diferentes doses utilizadas. Nos nossos casos, embora não tenha sido dosado o nível de calcitriol em SM, ele certamente foi muito maior que o utilizado por Grise et al. (1990), pois SM na dosagem de 100 mg/kg de peso por dia é muito tóxica para coelhos (Santos et al. 1976, Barros et al. 1981, Moraña et al. 1994), e o $1,25(OH)_2D_3$, na quantidade de planta administrada, deve estar várias vezes acima dos níveis fisiológicos.

O achado de macrófagos em fusão para formar células gigantes sugere que esse processo é resultante da ação do $1,25(OH)_2D_3$, como já foi demonstrado *in vitro* em macrófagos alveolares de camundongos (Abe et al. 1984) e em células mielóides (Roodman et al. 1985). É importante lembrar que o efeito de $1,25(OH)_2D_3$ pode diferir de um osso para o outro e até mesmo entre osso compacto e osso trabecular; assim Bikle et al. (1990) demonstraram que o osso trabecular e o osso cortical apresentam respostas diferentes à infusão de $1,25(OH)_2D_3$. Das nossas observações, pode-se concluir que o extrato de SM, na dose administrada a coelhos jovens, inibe a ação dos osteócitos, osteoblastos e osteoclastos no osso compacto, com acentuada citotoxicidade sobre os osteócitos, conduzindo à atrofia e necrose destas células. A inibição das atividades de reabsorção osteocítica e osteoclástica aparentemente é a responsável pela osteopetrose descrita na intoxicação por SM. Deve ser levada em conta, no entanto, a possibilidade de acentuadas variações na resposta à administração de SM, na dependência da quantidade da planta administrada, duração do experimento, sensibilidade das diferentes espécies animais frente à ação das plantas calcinogênicas assim como da resposta dos diferentes ossos e das diferentes partes de ossos examinados.

REFERÊNCIAS

Abe E., Shiina Y., Miyaura C., Tanaka H., Hayashi T., Kanegasaki S., Saito M., Nishi Y., DeLuca H.F & Suda T. 1984. Activation and fusion induced by 1α,25-dihydroxyvitamin D_3 and their relation in alveolar macrophages. Proc. Natl Acad. Sci. 81:7112-7116.

Baud C.A 1968. Submiscroscopic structure and functional aspects of the osteocyte. Clin. Orthop. 56:227-236.

Baud C.A. & Boivin G. 1978. Effects of hormone on osteocyte function and perilacunar wall structure. Clin. Orthop. 136:270-281.

Bar-Shavit Z., Teitelbaum S.T., Reitsma P., Pegg L.E., Trial J. & Kahn A.J. 1983. Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D_3. Cell Biology 80:5907-5911.

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

Baylink D., Sipe J., Wergedal J. & Whittemore O. 1973. Vitamin D-enhace osteocytic and osteoclastic bone resorption. Am. J. Physiol. 221:1343.

Bikle D.D., Halloran P., McGalliard-Cone C. & Morey-Holton E. 1990. Different responses of trabecular and cortical bone to $1,25(OH)_2D_3$ infusion. Am. J. Physiol. 259:E716-E722.

Carrillo B.J. 1973. Efecto de la intoxicación de *Solanum malacoxylon* en el sistema ósseo. Revta Investnes Agropec., B. Aires, 10:67-77.

Cormack D.M. 1991. Ham Histologia, cap.12. Osso, p.216-254. 9ª ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro.

Dämmrich K., Dirksen G. & Plank P. 1970. Über eine enzootische "Kalzinose" beim Rind. 3. Skelettveränderungen. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77:342-346.

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

Gimeno E.J. 1980. Estudios histopatologicos de las alteraciones oseas em ratas carenciadas em vitamina D y ratas intoxicadas con *Solanum malacoxylon*. Analecta Veterinária 12:61-108.

Grise M.A., Marks Jr. S.C., MacKay C.A. & Popoff S.N. 1990. Effects of $1,25(OH)_2D_3$ on osteoclast number and cytochemistry in normal and osteopetrotic rabbits. Am. J. Anat. 189:261-266.

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

Jande S.S. 1971. Fine structural study of osteocytes and their surrounding bone matrix with respect to their age in young chicks. J. Ultrastructure Res. 37:279-300.

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

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

Lucht U. 1980. Osteoclasts Ultrastructure and Functions, p.705-734. In: Carr J. & Daems W.T. (ed.) The Reticuloendothelial System. 1st ed. Vol. 1. Plenum Press, New York.

Norrdin R.W., Barros C.S.L., Queille M.L., Carré M. & Miravet L. 1979.

Acute effects of *Solanum malacoxylon* on bone formation rates in growing rats. Calcif. Tissue Int. 28:239-243.

Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C., Wasserman R. & Krook L. 1987. Enzootic calcinosis in sheep caused by the ingestion of *Nierembergia veitchii*. Pesq. Vet. Bras. 7:85-95.

Roodman G.D., Ibbotson K.J., McDonald B.R., Kuehl T.J. & Mundy G.R. 1985. 1,25- dihidroxyvitamin D_3 causes formation of multinucleated cells with several osteoclasts characteristics in cultures of primate marrow. Proc. Natl Acad. Sci. 82:8213-8217.

Santos M.N., Nunes V.A., Nunes I.J., Barros S.S., Wasserman R.H. & Krook L. 1976. *Solanum malacoxylon* toxicity: inhibition of bone resorption. Cornell Vet. 66:565-588.

Talmage R.W., Matthews J.L., Martin J.H., Kennedy J.W., Davis W.L. & Roycroft J.H. 1975. Calcitonin, phosphate and the osteocyte-osteoblaste bone cell unit. Proc. 5th Parathtroid Conf., Excerpta Medica Int. Congress Series 346:284-296.

Zichner L. 1970. Calcitonin-Wirkung auf die Osteocyten der heranwachsenden Ratte. Klin. Wschr. 48:1444-1448.

Pesq. Vet. Bras. 16(2/3):87-90, abr./set. 1996

EVOLUÇÃO DA IMUNIDADE PASSIVA CONTRA O VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA[1]

Silvia O. Hübner[2], Rudi Weiblen[3], Fernando L. Tobias[4], Nilton Cancian[4], Sonia A. Botton[5], Marcelo Oliveira[4] e Marildo Zanini[4]

ABSTRACT.- Hübner S.O., Weiblen R., Tobias F.L., Cancian N., Botton S.A., Oliveira M. & Zanini M. 1996. **[Evolution of passive immunity against bovine leukemia virus.]** Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira 16(2/3):87-90.* Depto Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi-Campus, Santa Maria, RS 97119-900, Brazil.

The evolution of colostral antibodies to bovine leukemia virus (BLV) was examined by testing serum samples of female calves collected from birth to 270 days of age. To observe the levels of BLV-specific antibodies in dams in the peri-natal period, serum samples were collected between days 35 pre-partum and days 28 post-partum. The presence of antibodies was examined by agar gel immunodiffusion tests (AGID). One week after ingestion of colostrum 100% (49/49) of the heifers gave positive results for BLV antibodies. The number of antibodiy-positive heifers decreased progressively until animals became sero-negative by day 180 of age. From the 41 sero-positive dams tested during the peri-natal period, three (7.3%) became sero-negative at that time. These data suggest that serologic diagnostic of BLV infectious with AGID should be performed after the 6th month of age in calves in order to avoid false-positive results due to passively acquired maternal antibodies. Moreover, serologic diagnosis in pregnant cows between 2 weeks pre and 4 weeks "post-partum" may give rise to false-negative results.

INDEX TERMS: Bovine leukemia virus, colostral immunity.

SINOPSE.- A presença de anticorpos colostrais contra o vírus da leucose bovina (BLV), foi examinada através de análise de amostras de soro de terneiras coletadas desde o nascimento até 270 dias de idade. Também foram coletadas amostras de soro de vacas entre 35 dias antes do parto até 28 dias após o parto. As amostras foram examinadas pelo teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Uma semana após a ingestão de colostro, 100% (49/49) das terneiras apresentaram anticorpos para o BLV. Posteriormente, houve uma queda progressiva do número de animais soropositivos, com o desaparecimento de níveis detectáveis de anticorpos até que todas as terneiras se tornassem soronegativas aos 180 dias de idade. De 41 vacas analisadas durante o período peri-parto, 3 (7,3%) apresentaram-se sorologicamente negativas neste período. Nas terneiras, os testes deverão ser realizados após o 6 mês de idade a fim de evitar resultados falso-positivos devido a anticorpos maternos passivamente adquiridos. Sugere-se também que para diagnóstico de infecções pelo BLV, a prova de IDGA seja realizada, nas vacas prenhes, somente até duas semanas antes do parto ou após 1 mês do parto.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Vírus da leucose bovina, imunidade colostral.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da leucose bovina (BLV) causa a enfermidade conhecida como leucose enzoótica bovina

[1]Aceito para publicação em 29 de julho de 1996.

Parte da tese de Mestrado do primeiro autor, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul. Projeto parcialmente financiado pelo CNPq e FAPERGS.

[2]Médico Veterinário, autônomo.

[3]Depto de Medicina Veterinária Preventiva, Microbiologia e Parasitologia, UFSM, 97119-900, Santa Maria, RS, Fax (055) 226 2347; bolsista do CNPq. (Autor para correspondência)

[4]Acadêmico de Medicina Veterinária, UFSM; bolsista de iniciação científica do CNPq.

[5]Médico Veterinário, Pós-graduando em Medicina Veterinária, UFSM.

ou leucose bovina. A sua importância deve-se principalmente às restrições no mercado internacional e também por perdas na produção e produtividade dos animais infectados. Países que obtiveram êxito no controle da enfermidade não importam animais soropositivos (Johnson & Kaneene 1991). O fato do BLV difundir-se lentamente e os baixos índices de prevalência encontrados na maioria dos rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul fornecem condições para que sejam implementados programas para controlar ou erradicar esta infecção (Flores et al. 1990, Moraes et al. 1996).

Os animais uma vez infectados tornam-se portadores por toda vida (Fenner et al. 1987). Porém, as provas sorológicas rotineiramente utilizadas não diferenciam anticorpos de animais infectados de anticorpos de origem colostral. Assim, terneiros que tenham ingerido colostro de vacas positivas para o BLV podem apresentar resultados falso-positivos nas provas sorológicas, caso os anticorpos recebidos passivamente ainda não tiverem desaparecido completamente (Johnson & Kaneene 1991). Há relatos variados sobre a duração dos anticorpos colostrais (Thurmond et al. 1982, Modena et al. 1984, Oshima et al. 1984, Villouta et al. 1990, Islas et al. 1992, Monke et al. 1992), sendo de grande interesse conhecer o tempo de duração desses anticorpos para que se possa realizar diagnósticos precoces da infecção.

Embora a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) seja considerada de alta especificidade e sensibilidade para a detecção de animais com infecções pelo BLV (Monke et al. 1992, Basilio et al. 1993), há relatos de que animais com baixas concentrações de anticorpos podem não responder a repetidos testes de IDGA (Miller et al. 1981, Van der Maaten et al. 1981a,b, Burridge et al. 1982, Roberts et al. 1988).

O presente trabalho teve como objetivo obter informações sobre a duração da imunidade passiva e sobre o comportamento sorológico de vacas prenhes positivas para BLV, sob as condições de criação de bovinos leiteiros da região central do estado do Rio Grande do Sul, através da análise de amostras de soro pela prova de IDGA.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experimentação

Vacas da raça Holandesa com diferentes idades e próximas do parto e suas filhas foram utilizadas no experimento. Os bovinos eram provenientes de uma propriedade produtora de leite tipo B da região central do Estado do Rio Grande do Sul. Somente fêmeas foram incluídas, pois o manejo da propriedade determinava que os machos fossem descartados logo após o nascimento. O manejo local também deliberou que após o nascimento as terneiras fossem afastadas de suas mães e colocadas em terneireiras individuais. A fim de assegurar que houvesse ingestão de colostro, era fornecido um "pool" de colostro nos dois primeiros dias de vida. A partir disso, os animais recebiam uma mistura de leite "in natura" de várias vacas e, gradativamente, concentrado e feno foram incluídos na dieta. Aproximadamente aos dois meses de idade efetuava-se o desmame, quando as terneiras eram conduzidas para piquetes com até seis animais.

Material para exames

Para verificar a prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina (BLV) nas vacas, analisaram-se amostras de soro coletadas em torno de 28 dias antes do parto. Para acompanhar o comportamento sorológico do BLV nas vacas soropositivas, realizaram-se coletas desde os 35 dias pré-parto e, posteriormente, nos dias 28, 21, 14, 7, 3, e 1 antes do parto e, também, no dia do parto. Após o parto as coletas foram feitas semanalmente até 28 dias pós-parto. A coleta de sangue foi efetuada nas terneiras antes da ingestão de colostro e, às 6, 12 e 24 horas após a ingestão do colostro e aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 90, 120, 150, e 180, 210, 240 e 270 dias de idade.

Método sorológico

O teste de IDGA foi realizado para detectar anticorpos contra a principal glicoproteína do envelope (gp 51) do BLV, segundo técnica descrita por Miller & Van der Maaten (1977), com algumas modificações descritas por Flores et al. (1988). O antígeno foi produzido em células FLK (Romero & Rowe 1981), e era armazenado em alíquotas a uma temperatura de -18ºC. O soro controle positivo foi obtido de um animal soropositivo para o BLV através de identidade de reação no teste de IDGA, e era igualmente armazenado em alíquotas e conservado a -18ºC. Foram analisadas pela imunodifusão 298 amostras de soro correspondentes a coletas sucessivas de 41 vacas positivas, e 547 correspondentes a coletas sucessivas de 49 terneiras que se apresentaram positivas após a ingestão de colostro. As amostras eram consideradas positivas quando havia uma linha de identidade entre o antígeno e o soro testado e negativas quando não havia formação de uma linha de precipitação entre o poço da amostra e o do antígeno apresentando identidade com a linha do soro controle.

Análise estatística

Para verificar a evolução dos anticorpos para o BLV foi utilizado o método de regressão, conforme descrito por Steel & Torrie (1980).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento sorológico de 41 vacas foi acompanhado pela prova de IDGA, sendo que 3 (7,3%) apresentaram sorologia falsamente negativa neste período. Duas vacas apresentaram resultados sorológicos negativos aos 7 dias anteriores, e uma no dia do parto. A sorologia negativa manteve-se por alguns dias após o parto. Os resultados sorológicos destes três animais estão expressos na Figura 1.

A evolução dos anticorpos para o BLV está demonstrada na Figura 2. A análise estatística revelou um alto coeficiente de correlação (R2= 0,92) entre a frequência de animais positivos e a idade. Pela equação estimada pode-se esperar que 100,0% dos animais apresentem anticorpos aos 7 dias de vida, 36,82% aos 90 dias, 21,06% aos 120 dias e somente 15,36% dos animais possuam anticorpos contra a principal glicoproteína do envelope (gp 51) do BLV aos 180 dias. Através da equação obtida pela análise de regressão foi estimado uma queda progressiva na frequência de animais positivos em função da idade, sendo que 15,36% dos animais aos 180 dias de idade ainda eram sorologicamente positivos para o BLV (Fig. 2). Cabe ressaltar que

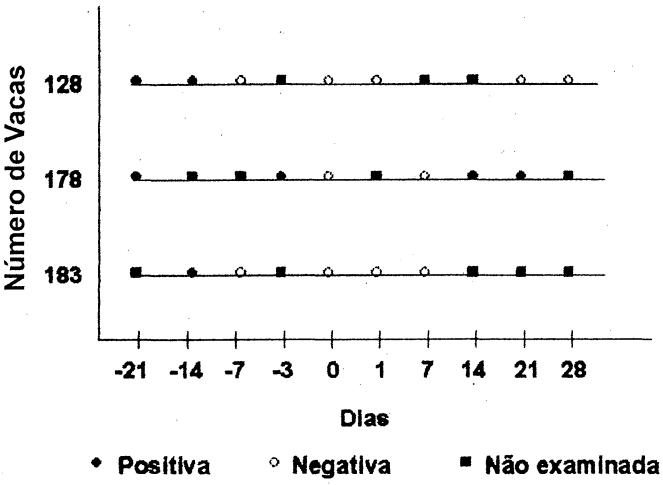


Fig. 1. Anticorpos contra o vírus da leucose bovina (BLV) em três vacas que apresentaram resultados sorológicos negativos quando testadas por imunodifusão em gel de ágar (IDGA) nas proximidades do parto.

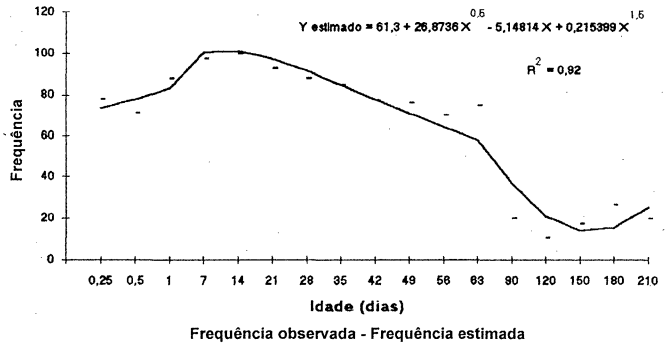


Fig. 2. Evolução dos anticorpos colostrais contra o vírus da leucose bovina (BLV) no soro de 49 terneiras, desde 6 horas após a ingestão do colostro até 210 dias após o nascimento, mensurados por imunodifusão em gel de ágar (IDGA).

foram incluídas na análise estatística um total de 13 animais. Oito terneiras filhas de vacas soronegativas para o BLV tornaram-se positivas após o consumo do "pool" de colostro. Três terneiras soroconverteram após sete dias de idade e duas terneiras que foram consideradas como infectadas in utero (animais soropositivos antes da ingestão de colostro). Ao serem retirados os animais com infecção intra-uterina pelo BLV e aqueles com infecção ativa, nos remanescentes houve desaparecimento dos anticorpos colostrais após 180 dias de idade, o que corrobora com os achados de Thurmond et al. (1982), Oshima et al. (1984), Islas et al. (1992) e Monke et al. (1992). Islas et al. (1992) detectaram uma duração dos anticorpos colostrais contra o BLV pela prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) de até 4 meses, mas utilizando ensaios imunoenzimáticos (ELISA) a presença destes anticorpos prorrogou-se até os 6 meses de idade, o que pode ser explicado por uma maior sensibilidade do método ELISA em relação a IDGA. Modena et al. (1984) detectaram alguns terneiros positivos até 300 dias de idade, mas presumiram não ser devido a imunidade passiva, e sim à infecção intra-uterina ou através do colostro ou leite. Villouta et al. (1990) relatam a única descrição de persistência da imunidade passiva para o BLV em animais com até 8 meses de idade. O trabalho de Thurmond et al. (1982) mostrou que 50% dos terneiros tornaram-se sorologicamente negativos aos 95 dias de idade. No presente estudo somente 36,82% possuíam anticorpos ao 90º dia após o nascimento. Possíveis causas das variações encontradas na duração dos anticorpos colostrais para BLV podem ser devido à falta de padronização da técnica de IDGA, bem como à ingestão de colostro em diferentes quantidades e com variadas concentrações de anticorpos específicos, como já postulado por Thurmond et al. (1982). Os achados permitem a afirmação que para o diagnóstico sorológico de infecções pelo BLV, os testes devem ser realizados a partir do 6º mês de vida. A partir dessa idade provavelmente os animais estão suscetíveis à infecção por esse agente.

Os anticorpos foram considerados como consequência de infecção ativa nas terneiras que, após pelo menos dois testes negativos consecutivos, realizados num período de 30 dias, voltaram a apresentar sorologia positiva pela prova de IDGA, conforme Oshima et al. (1981), Roberts et al. (1982), Shettigara et al. (1986) e Monke et al. (1992). A infecção ativa foi detectada após a transferência dos animais de seus currais individuais para piquetes onde eram agrupados em aproximadamente seis animais. A infecção nos piquetes provavelmente ocorreu subsequente ao agrupamento dos animais em lotes.

Das 41 vacas positivas para a presença de anticorpos contra o BLV, três (7,3%) apresentaram-se falsamente negativas no período peri-parto (Fig. 2) e as demais mantiveram-se positivas durante o período de 35 dias antes do parto até 28 dias após o parto. Esses resultados concordam com o trabalho de Burridge et al. (1982) que detectaram uma queda significativa no título de anticorpos na época do parto, através das provas de IDGA e radioimunoprecipitação. Quedas em duas a três diluições no título de anticorpos para BLV entre 1 mês pré-parto e o parto, foram apresentadas por 44% das vacas. Todas, com exceção de uma, mostraram aumento no título dentro de 1 mês pós-parto. Van der Maaten et al. (1981a,b), Miller et al. (1981) e Roberts et al. (1988) também obtiveram sorologia falsamente negativa pela prova de IDGA em animais com baixos títulos de anticorpos. A diminuição no nível de anticorpos é explicada pela transferência maciça de imunoglobulinas para o colostro no período que antecede o parto (Brandom et al. 1971, Logan et al. 1973, Sasaki et al. 1976). Duas vacas do presente estudo tiveram sorologia negativa a partir do 7º dia antes do parto e somente uma a partir do dia do parto. Esses achados concordam com Sasaki et al. (1976), os quais encontraram transferência máxima de imunoglobulinas entre 1 a 3 dias antes do parto e, uma

concentração de imunoglobulinas na secreção mamária imediatamente antes do parto, de 10 a 15 vezes maior do que a encontrada no plasma materno. Porém, contraria a afirmação de Johnson & Kaneene (1991) de que as vacas devem ser testadas pelo menos 6 semanas antes do parto, e também a Brandom et al. (1971) que acreditam que o nível de imunoglobulinas alcança uma máxima concentração na glândula mamária e uma máxima diminuição na circulação sanguínea materna 2 a 3 semanas antes do parto, períodos em que as vacas desse estudo ainda apresentaram-se soropositivas. No entanto, deve ser ressaltado aqui que, embora a sorologia falsamente negativa sugira uma queda no título de anticorpos, no presente estudo não foram titulados os anticorpos para o BLV.

Baseados nos dados obtidos nesse estudo fica evidente que os testes sorológicos devem ser realizados no máximo até 2 semanas antes do parto, ou então somente após 1 mês do parto, para minimizar a chance de que vacas infectadas pelo BLV sejam mantidas no rebanho como sendo livres da infecção.

REFERÊNCIAS

Basilio J.I.M., Tavera F.J.T., Aluja A.S. & Escamilla R.M.G. 1993. Estudio comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusión en el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina. Vet. Méx. 24(1):21-25.

Brandom M.R., Watson D.L. & Lascelles A.K. 1971. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. Aust. J. Biol. Med. Sci. 49:613-623.

Burridge M.J., Thurmond M.C., Miller J.M., Schmerr M.J.F. & Van der Maaten M.J. 1982. Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. Can. J. Comp. Med. 46:270-271.

Fenner F., Bachmann A., Gibbs E.P.J., Murphy F.A., Studdert R.R.M.J. & White D.O. 1987. Veterinary Virology. Academic Press, New York . 659p.

Flores E.F., Weiblen R., Pereira N.M., Portolan J.A.B. & Chielle L.L. 1988. Prevalência de anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) no rebanho leiteiro de Santa Maria, RS. Revta Centro Ciênc. Rurais, Sta Maria, 18(1):67-73.

Flores E.F., Weiblen R. & Rebelatto M.C. 1990. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) na região central do Rio Grande do Sul. Hora Vet., Porto Alegre, 58:25-29.

Islas A.L., López J.M., Montes G.O., Bórques F.S. & Torres C.S. 1992. Detección de anticuerpos antivirus de la leucosis enzoótica bovina en terneros de lechería alimentados con calostro de vacas seropositivas en los primeros meses de vida. Av. Cienc. Vet. 7(1):51-55.

Johnson R. & Kaneene J.B. 1991. Bovine Leukemia Virus. Part IV. Economic impact and control measures. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 13(11):1727-1737.

Logan E.F., Penhal W.J. & Jones R.A. 1973. Changes in serum inmunoglobulin levels of colostrum fed calves during the first twelve weeks postpartum. Res. Vet. Sci. 14: 394-397.

Miller J.M. & Van der Maaten M.J. 1977. Use of glycoprotein antigen in the immunodifusion test for bovine leukemia virus antibodies. Europ. J. Cancer. 13:1369-1375.

Miller J.M., Schmerr M.J.F. & Van der Maaten M.J. 1981. Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. Am. J. Vet. Res. 42:5-8.

Modena C.M., Leite R.C. & Moreira E.C. 1984. Evolução sorológica da leucose enzoótica bovina em bezerros. Arqs Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 12:93-97.

Monke D.R., Rohde R.F., Hueston W.D. & Milburn R.J. 1992. Estimation of the sensitivity and specificity of the agar gel immunodiffusion test for bovine leukemia virus: 1,296 cases (1982-1989). J. Am. Vet. Med. Assoc. 200(12):2001-2004.

Moraes M.P., Weiblen R., Flores E.F., Oliveira I.C.D., Rebelato M.C., Zanini M., Rabuske M., Hübner S.O. & Pereira N.M. 1996. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul. Ciência Rural. 26(2):257-262.

Oshima K., Okada K., Numakunai S., Yoneyama Y., Sato S. & Takahashi K. 1981. Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood-sucking tabanid flies. Jpn. J. Vet. Sci. 43: 79-81.

Oshima K., Morimoto N., Kagawa Y., Numakuna S., Hirano T. & Kayano H. 1984. A survey for maternal antibodies to bovine leukemia virus (BLV) in calves born to cows infected with BLV. Jpn. J. Vet. Sci. 46(4):583-586.

Roberts D.H., Lucas M.H., Wibberley G. & Chasey D. 1982. An investigation into the susceptibility of cattle to bovine leukosis virus following inoculation by various routes. Vet. Rec. 110:222-224.

Roberts D.H., Lucas M.H., Wibberley G. & Westcott D. 1988. Response of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus to bovine leukosis virus. Vet. Rec. 122:293-296.

Romero C.H. & Rowe C.A. 1981. Enzootic bovine leukosis in Brazil. Trop. Anim. Hlth Prod. 13:107-111.

Sasaki M., Davis C.L. & Larson B.L. 1976. Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition. J. Dairy Sci. 59:2046-2055.

Shettigara P.T., Saagh B.S. & Lobinowich E.M. 1986. Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodiffusion test. Can. J. Vet. Res. 50(2):221-226.

Steel R.G.D. & Torrie J.H.1980. Principles and Procedures of Statistics - A Biometrical Approach. McGraw-Hill, New York. 633p.

Thurmond M.C., Carter R.L., Puhr D.M. & Burridge M.J. 1982. Decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus with application to detection of calfhood infection. Am. J. Vet. Res. 43(7):1152-1155.

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.

Villouta G.C., Segovia P.C., Montes G.O. & Durán K.Y. 1990. Duración y titulos de anticuerpos colostrales antivirus leucemia bovina y transmisión natural de la infección en terneras de un predio de la región metropolitana, Chile. Av. Cienc. Vet. 5(2):114-118.