

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**MEDICINA VETERINÁRIA**

**TESE**

**Neuroxicose em bovinos associada ao consumo de  
“cevada” (bagaço de malte) contaminada por  
*Aspergillus clavatus* no Estado do Rio de Janeiro**

**Glenda Ribeiro de Oliveira**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA**

**NEUROTOXICOSE EM BOVINOS ASSOCIADA AO CONSUMO  
DE “CEVADA” (BAGAÇO DE MALTE) CONTAMINADA POR  
*Aspergillus clavatus* NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**GLENDIA RIBEIRO DE OLIVEIRA**

*Sob a Orientação do Professor*

**Paulo Vargas Peixoto**

Tese submetida como requisito parcial do grau de **Doutor em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Patologia Animal

Seropédica-RJ

Agosto de 2016

636.208959

O48n

T

Oliveira, Glenda Ribeiro de, 1974-  
Neurotoxicose em bovinos  
associada ao consumo de "cevada"  
(bagaço de malte) contaminada por  
Aspergillus clavatus no Estado do  
Rio de Janeiro / Glenda Ribeiro de  
Oliveira. - 2016.

xvi, 88 f.: il.

Orientador: Paulo Vargas Peixoto.  
Tese (doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Curso de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, 2016.

Bibliografia: f. 79-88.

1. Bovino - Toxicologia - Teses.  
2. Bovino - Doenças - Teses. 3.  
Bovino - Alimentação e rações -  
Teses. 4. Cevada como ração -  
Contaminação - Rio de Janeiro  
(Estado) - Teses. 5. Aspergillus -  
Teses. I. Peixoto, Paulo Vargas,  
1958- II. Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro. Curso de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária.  
III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

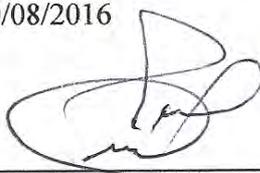
INSTITUTO DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

GLENDA RIBEIRO DE OLIVEIRA

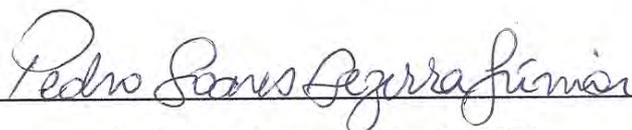
Tese submetida como requisito parcial do grau de **Doutor em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Patologia Animal

TESE APROVADA EM 30/08/2016



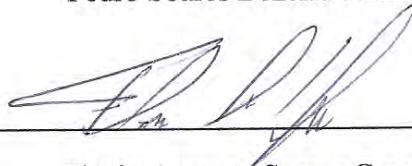
---

Paulo Vargas Peixoto Dr. UFRRJ (Orientador)



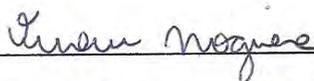
---

Pedro Soares Bezerra Júnior Dr. UFPA



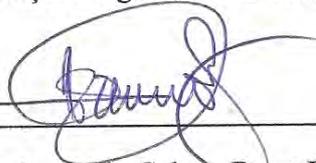
---

Flávio Augusto Soares Graça Dr. UENF



---

Vivian Assunção Nogueira de Carvalho Dr<sup>a</sup> UFRRJ



---

Luís Armando Calvão Brust Dr. FAA

## AGRADECIMENTOS

Ao meu saudoso e querido pai, José Maria de Oliveira que partiu cedo demais, mas deixou impregnado na minha memória, seu exemplo de honestidade e sua dedicação às filhas e ao trabalho. À minha mãe Elvinês e aos meus sogros, Rosa e Ubiratan por me ajudarem com as crianças, sempre que foi preciso, para que eu pudesse estudar e trabalhar. À minha irmã Samantha, pelo orgulho que sente de mim.

Ao meu marido Leonardo pela paciência, pelo incentivo, pelo apoio, sempre presente na minha vida e às nossas filhas Luiza e Liz, pelo nosso amor incondicional.

Ao professor Paulo Peixoto pela orientação, confiança e oportunidade que me proporcionou.

Aos professores dos Programas de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e Ciências Veterinárias, pelos ensinamentos, pelas contribuições e pela incansável luta pela ciência no Brasil. Um agradecimento especial ao nosso querido professor Tokarnia, pela alegria que me proporcionou durante nosso reencontro na pós-graduação, pela sua generosidade, pelo seu exemplo de dedicação ao trabalho, à pesquisa e pela sua contribuição à Medicina Veterinária no país.

Ao professor Pedro Soares Bezerra Júnior pela atenção, pela sempre presteza em me ajudar em todas as etapas deste trabalho e à colega médica veterinária Joana Paglis por viabilizar a experimentação.

Ao professor e colega de turma Luciano da Silva Alonso do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela atenção e pelo auxílio na identificação dos grupamentos musculares

Ao professor Marcelo Elias Fraga e ao Laboratório de Biologia de Fungos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelas análises micológicas, imprescindíveis a esse trabalho.

Ao professor Carlos Mallmann e ao Laboratório de Micotoxicologia da Universidade de Santa Maria pela realização das análises micotoxicológicas.

Aos colegas da Pós-Graduação, Samay Zilmann, Ana Paula, Mariana, Taína pelo apoio, pela paciência e por toda a ajuda que me deram durante o curso. Ao colega André Marandola, especialmente, pelo auxílio com as fotos da microscopia, além do apoio durante todas as necropsias; ao colega de trabalho e professor Luís Armando Calvão Brust, às graduandas Carol e Juliana, pelo apoio incondicional e imprescindível nas necropsias.

Ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial, às meninas Alana e Tati e ao professor Fábio Scott pela realização dos exames complementares.

À Fazenda São Fernando, em especial, ao gerente Marcos e aos funcionários “Zominho” e “Baiano” pela cessão do local e do animal para o experimento; pela gentileza, disponibilidade e solicitude em me ajudar.

À minha querida e eterna chefe, Alzelina Luiza da Gloria Santos e aos meus colegas de trabalho pelo apoio e compreensão.

E a todos os amigos queridos que acompanharam o meu caminho até aqui, recebam minha sincera e eterna gratidão.

## RESUMO

OLIVEIRA, Glenda Ribeiro de. **Neurotoxicose em bovinos associada ao consumo de “cevada” (bagaço de malte) contaminada por *Aspergillus clavatus* no Estado do Rio de Janeiro**. 2016. 118p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica-RJ, 2016.

Descrevem-se quatro surtos de uma doença neurológica que afetou bovinos de aptidão leiteira que consumiam “cevada” (bagaço de malte) contaminada por *Aspergillus clavatus* nos municípios de Valença, Paty do Alferes e Barra Mansa, no Estado do Rio de Janeiro. Em todas as propriedades, a cevada estocada apresentou visível contaminação fúngica e somente os animais que ingeriram o subproduto adoeceram. A morbidade variou entre 41,42% e 73,08%, a mortalidade entre 33,33% e 69,23% e a letalidade entre 51,11% e 94,73%. Os animais evidenciaram tremores musculares, hiperestesia, ataxia, paresia e paralisia progressivas e marcada perda de peso. Os mais afetados caminhavam com apoio sobre os boletos flexionados e alguns assumiam a posição de "cão sentado". Quando os animais eram forçados a movimentarem-se, as quedas eram frequentes. Houve acentuada queda na produção leiteira, embora o apetite e a dipsia tenham se mantido normais até próximo à morte ou à eutanásia. A evolução clínica variou de 1 a 16 dias. Dos animais que se recuperaram, quatro permaneceram com sequelas locomotoras leves. As alterações macroscópicas incluíram áreas pálidas focais na musculatura cardíaca, músculos semitendíneo, semimembrâneo, adutor, pectíneo e *Longissimus dorsi*. O quadro histopatológico caracterizou-se por alterações degenerativo-necróticas, tumefação, vacuolização e cromatólise nos neurônios dos núcleos dos pedúnculos cerebelares, da base do cérebro, da medula oblonga e do “H” medular. Histologicamente, as lesões musculares caracterizaram-se por degeneração e necrose coagulativa, com mineralização, por vezes, incipiente. Em um bovino havia, adicionalmente, necrose coagulativa no miocárdio e nefrose mioglobinúrica. O cultivo micológico das amostras de cevada resultou no isolamento e identificação do fungo *A. clavatus*. O quadro clínico patológico foi reproduzido experimentalmente em ovinos que consumiram 40g/kg de cevada por dia, coletada de duas das propriedades investigadas; esses animais desenvolveram sinais clínicos e lesões microscópicas, em grande parte, similares às observadas nos bovinos. Conclui-se que embora os resíduos da indústria cervejeira tenham razoável relação custo-benefício na alimentação de bovinos, é necessário que se observem alguns cuidados para evitar eventuais intoxicações e consequentes prejuízos econômicos.

**Palavras-chave:** Neurotoxicose, Cevada, *Aspergillus clavatus*

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Glenda Ribeiro de. **Neurotoxicosis in cattle associated with consumption of malted barley waste contaminated with *Aspergillus clavatus* in the state of Rio de Janeiro**. 2016. 107p. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine, Animal Pathology). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica-RJ, 2016.

Four outbreaks of a neurological disease affecting dairy cattle which consumed malted barley waste contaminated with *Aspergillus clavatus* in the municipalities of Valença, Paty do Alferes, and Barra Mansa, in the state of Rio de Janeiro, are described. In all farms, stored malted barley waste exhibited visible fungal contamination and only the animals that ingested the by-product got sick. Animals exhibited muscle tremors, hyperesthesia, ataxia, progressive paresis and paralysis, and marked weight loss. Affected animals were walking with knuckling of hindlimb fetlocks, and some would assume a sitting-dog position. When forced to move around, falls were frequent. There was marked decrease in milk production, even though appetite and thirst remained normal up to the moment of death or euthanasia. Clinical evolution varied from 1 to 16 days. From the animals that recovered, four remained with mild locomotor system sequelae. Morbidity varied between 41.42% and 73.08%, mortality between 33.33% and 69.23%, and lethality between 51.11% and 94.73%. Macroscopic alterations included focal pale areas on the myocardium, semitendinosus, semimembranosus, adductor, pectineus, and *Longissimus dorsi* muscles. Histopathology was characterized by degenerative-necrotic alterations, tumefaction, vacuolation, and chromatolysis of neurons of cerebellar peduncle nuclei, base of the brain, medulla oblongata, and grey matter of the medulla (the H shape). At histology, muscular lesions were characterized by degeneration and coagulative necrosis, at times with incipient mineralization. In one of the bovines, there was also coagulative necrosis of the myocardium, and presumably, myoglobinuric nephrosis. Fungal culture of samples of malted brewer waste resulted in isolation and identification of *A. clavatus*. The clinical pathological picture was reproduced experimentally in sheep which consumed 40g/kg of malted brewer waste per day, which was collected from the two investigated farms; these animals developed clinical signs and microscopic lesions similar to those observed in bovines. We conclude that even though brewery by-products have a reasonable cost/benefit ratio for bovine feeding, there is a need to observe steps to avoid eventual poisoning and consequent economical losses.

**Keywords:** Neurotoxicosis, Malted barley waste, *Aspergillus clavatus*

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b> Local de armazenamento da cevada na <i>Propriedade A</i> com paredes revestidas de bambu e cobertura de lona.	<b>20</b>
<b>FIGURA 2-</b> Cevada da <i>Propriedade A</i> apresentando bolor de coloração branca com aspecto de “algodão”.	<b>21</b>
<b>FIGURA 3-</b> a Bolor de coloração cinza-esverdeada no fundo e 3-b acinzentado nas paredes de bambu no local de armazenamento da cevada na <i>Propriedade A</i> .	<b>21</b>
<b>FIGURA 4-</b> Neurotoxicose por <i>Aspergillus clavatus</i> . <i>Propriedade B</i> , Bovino 5 apoiando-se sobre os boletos dos membros pélvicos.	<b>22</b>
<b>FIGURA 5-</b> Aspecto da cevada que restou armazenada no tanque da <i>Propriedade D</i> . Presença de bolor de coloração cinza-esverdeada na superfície da cevada.	<b>24</b>
<b>FIGURA 6-</b> Bolor na parede do tanque de armazenamento da cevada da <i>Propriedade D</i> .	<b>24</b>
<b>FIGURA 7</b> a, b- Neurotoxicose causada por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade D</i> , Bovino 1. <b>a.</b> Animal após queda, levantando-se com abdução e flexão não usual do membro torácico esquerdo e “emboletamento” do membro pélvico direito, <b>b.</b> Animal em movimento, com dificuldade de elevar a região pélvica.	<b>25</b>
<b>FIGURA 8-</b> Neurotoxicose causada por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade D</i> , Bovino 1. Ataxia, animal em queda após movimentação forçada com membro pélvico “emboletado” e membros torácicos em posição atípica.	<b>26</b>
<b>FIGURA 9--</b> Neurotoxicose por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade D</i> , Bovino 2. Hipermetria dos membros torácicos com posição atípica durante a marcha.	<b>27</b>
<b>FIGURA 10-</b> Neurotoxicose por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade D</i> , Bovino 2. Hipermetria dos membros pélvicos. Observa-se que os membros torácico e pélvico direitos se tocam.	<b>27</b>
<b>FIGURA 11-</b> Neurotoxicose por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade D</i> , Bovino 2.	<b>28</b>

Dismetria e abdução exagerada dos membros torácicos. Região pélvica baixa denotando fraqueza muscular dos membros pélvicos.	
<b>FIGURA 12-</b> Neurotoxicose por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade D</i> , Bovino 2. “Emboletamento” do membro pélvico direito.	<b>28</b>
<b>FIGURA 13-</b> Neurotoxicose por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade D</i> , Bovino 3. Apoio sobre os boletos dos membros pélvicos e hipermetria com deslocamento do apoio para os membros torácicos.	<b>29</b>
<b>FIGURA 14-</b> Neurotoxicose por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade D</i> , Bovino 4. Decúbito lateral e opistótono.	<b>30</b>
<b>FIGURA 15-</b> Tanque de armazenamento da cevada da <i>Propriedade E</i> .	<b>33</b>
<b>FIGURA 16-</b> a, b, c, d- Neurotoxicose por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade E</i> , Bovino 9. Sequência de movimentos realizados na locomoção diante da mudança de direção. c,d. Animal arrasta a pinça do membro pélvico direito antes da flexão do jarrete.	<b>36</b>
<b>FIGURA 17-</b> Tanque de armazenamento da cevada na <i>Propriedade F</i> .	<b>37</b>
<b>FIGURA 18-</b> Aspecto da superfície da cevada apresentando bolor escuro, azul esverdeado na <i>Propriedade F</i> . a-cevada recolhida do pasto após a retirada da camada superficial do tanque; b- cevada encontrada no tanque.	<b>38</b>
<b>FIGURA 19-</b> a b- Neurotoxicose por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade F</i> . Bovino 9. a- Coleta de urina por micção espontânea; b-Urina de coloração castanho-avermelhada.	<b>41</b>
<b>FIGURA 20-</b> a, b- Neurotoxicose por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade F</i> . Bovino 10. a-Queda na sala de ordenha e depois de inúmeras tentativas de levantar o animal, nova queda (b) no curral com posicionamento caudal dos membros pélvicos.	<b>42</b>
<b>FIGURA 21-</b> Lesões musculares observadas na neurotoxicose por <i>A. clavatus</i> . Surto 1, <i>Propriedade B</i> , Bovino 5. Áreas pálidas focais no músculo semitendíneo.	<b>44</b>
<b>FIGURA 22-</b> Lesões musculares observadas na neurotoxicose por <i>A. clavatus</i> . <i>Propriedade E</i> . Bovino 1. Áreas pálidas em alternância com áreas de coloração normal nos músculos semimembrâneo e adutor, com presença de hemorragia.	<b>45</b>
<b>FIGURA 23-</b> Lesões musculares observadas na neurotoxicose por <i>A.</i>	<b>46</b>

<i>clavatus. Propriedade F. Bovino 3, músculo semimembranáceo.</i>	
<b>FIGURA 24-</b> Lesões musculares observadas na neurotoxicose por <i>A. clavatus. Propriedade F. Bovino 3, músculo pectíneo.</i>	<b>46</b>
<b>FIGURA 25-</b> Lesões musculares observadas na neurotoxicose por <i>A. clavatus. Propriedade F. Bovino 4, músculo papilar. Áreas pálidas particularmente próximas ao endocárdio.</i>	<b>47</b>
<b>FIGURA 26-</b> Lesões musculares observadas na neurotoxicose por <i>A. clavatus. Propriedade F. Bovino 3. Extensa área focal pálida no miocárdio, parede do ventrículo esquerdo.</i>	<b>47</b>
<b>FIGURA 27-</b> Lesões musculares observadas na neurotoxicose por <i>A. clavatus. Propriedade F. Bovino 3. Músculo psoas com coloração rubra, de aspecto vítreo.</i>	<b>48</b>
<b>FIGURA 28-</b> <i>Propriedade F, Bovino 3. Mesencéfalo. Cromatólise-necrose com e sem-picnose; neurônio em lise. HE Obj.40.</i>	<b>50</b>
<b>FIGURA 29-</b> <i>Propriedade F, Bovino 9. Tumefação de neurônios com cariólise (núcleo da base) HE Obj.40.</i>	<b>50</b>
<b>FIGURA 30-</b> <i>Propriedade F, Bovino 4. Cromatólise com deslocamento dos núcleos para a periferia com e sem picnose, cariólise e/ou lise. Núcleo ambíguo. HE Obj.40.</i>	<b>51</b>
<b>FIGURA 31-</b> <i>Propriedade E, Bovino 8. Neurônios cromatolíticos em núcleo da base do cerebelo. Na porção inferior da figura, neurônio cromatolítico com picnose; na superior, neurônio cromatolítico tumefeito com cariólise (sombra do núcleo). HE. Obj. 40.</i>	<b>51</b>
<b>FIGURA 32-</b> <i>Propriedade E, Bovino 8 Neurônio cromatolítico (tigrólise acentuada), tumefeito, de aspecto espumoso em núcleo da base do cerebelo (detalhe da figura anterior). HE. Obj 40.</i>	<b>52</b>
<b>FIGURA 33-</b> <i>Propriedade F, Bovino 3. Núcleo da base do cerebelo Cromatólise-necrose com e sem picnose HE Obj.40.</i>	<b>52</b>
<b>FIGURA 34-</b> <i>Propriedade F, Bovino 3. Núcleo da base do cerebelo. Cromatólise-vacuolização-tumefação HE Obj.10.</i>	<b>53</b>
<b>FIGURA 35-</b> <i>Propriedade F, Bovino 3. Núcleo da base do cerebelo. Cromatólise-vacuolização-tumefação HE Obj.40.</i>	<b>53</b>

<b>FIGURA 36-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 3. Núcleo da base do cerebelo. Neurônio cromatolítico e neurônio cromatolítico vacuolizado. HE Obj.40.	<b>54</b>
<b>FIGURA 37-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 3. Núcleo da base do cerebelo. Neurônio cromatolítico, extremamente tumefeito, de aspecto espumoso, com extravasamento do conteúdo citoplasmático para o espaço perineuronal; dois outros neurônios cromatolíticos. HE Obj.40.	<b>54</b>
<b>FIGURA 38-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 3. Neurônio cromatolítico, tumefeito, de aspecto espumoso com pequenos vacúolos. Núcleo da base do cerebelo. HE Obj.40.	<b>55</b>
<b>FIGURA 39-</b> Figura 39- <i>Propriedade B</i> , Bovino 5. a-Necrose cromatolítica em neurônios dos cornos ventrais da medula espinhal. HE. Obj 10. b- Outro campo. HE. Obj 20.	<b>55</b>
<b>FIGURA 40-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 4. Neurônio cromatolítico muito tumefeito (seta); outros neurônios com cromatólise, cariólíticos (cornos ventrais da medula espinhal) HE Obj.40.	<b>56</b>
<b>FIGURA 41-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 4. Neurônio necrótico (núcleo caudato) HE Obj.40.	<b>56</b>
<b>FIGURA 42-</b> <i>Propriedade D</i> , Bovino 4. Hialinização (necrose) de fibras musculares esqueléticas cortadas longitudinalmente. HE. Obj 20.	<b>57</b>
<b>FIGURA 43-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 4. Necrose muscular polifásica com mineralização distrófica. HE Obj 10.	<b>57</b>
<b>FIGURA 44-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 4. Necrose muscular hialina e flocular, com mineralização distrófica. HE Obj.20.	<b>58</b>
<b>FIGURA 45-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 4. Necrose coagulativa de fibras musculares esqueléticas. Notar infiltração de células mononucleares em meio a detritos necróticos (macrófagos e células satélites) HE Obj. 20; outro campo, lesão mais adiantada.	<b>58</b>
<b>FIGURA 46-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 4. Maior aproximação. HE Obj.40.	<b>59</b>
<b>FIGURA 47-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 4. Necrose muscular com mineralização HE Obj.20.	<b>59</b>
<b>FIGURA 48-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 4. Necrose muscular hialina e flocular. HE. Obj.40.	<b>60</b>
<b>FIGURA 49-</b> <i>Propriedade F</i> , Bovino 4. Necrose muscular hialina e flocular	<b>60</b>

com mineralização HE Obj.40.

**FIGURA 50-** *Propriedade F*, Bovino 9. Nefrose mioglobinúrica; marcado aumento da filtração glomerular (seta) com dilatação dos túbulos por excesso de filtrado (cabeça de seta) HE Obj.10. **61**

**FIGURA 51-** *Propriedade F*, Bovino 9. Nefrose mioglobinúrica (detalhe) HE Obj.63. **61**

**FIGURA 52-** *Propriedade F*, Bovino 9. Área de necrose coagulativa hialina e floccular (miocárdio) HE Obj.20. **62**

**FIGURA 53-** *Propriedade F*, Bovino 9. Área de necrose coagulativa hialina e floccular (miocárdio) HE Obj.40. **62**

**FIGURA 54-** Aspecto macroscópico da colônia de *A. clavatus* em diferentes meios de cultura; a- Meio de Creatina Sacarose Ágar (CREA), b- Meio de Ágar Extrato de levedura Czapek com 20% de sacarose (CY20S), c- Meio de Ágar Extrato de levedura (CYA), e-Meio de Ágar Extrato de Malte (MEA). **64**

**FIGURA 55-** Aspectos microscópicos característicos do fungo *A. clavatus*. Vesícula em forma de clava, recoberta por fiáldes curtas e conídios azuis esverdeados. **64**

**FIGURA 56-** a, b, c, d- Experimento a campo, ovino ; a,b- membros pélvicos flexionados e afastados, com deslocamento do apoio para os membros torácicos; c,d- membros pélvicos afastados e torácicos unidos. **67**

**FIGURA 57-** Reprodução experimental. Neurônios cromatolíticos, necróticos e tumefeitos. Cornos ventrais da medula espinhal. HE Obj. 40. **68**

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>QUADRO 1-</b> Micotoxinas identificadas em culturas e materiais contaminados por <i>A. clavatus</i> e seus efeitos.	<b>6</b>
<b>QUADRO 2-</b> Análises micotoxicológicas realizadas em amostras de cevada e pão, utilizados na alimentação dos animais da <i>Propriedade F</i> , surto 4.	<b>65</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1-</b> Dados epidemiológicos do surto 1 envolvendo três propriedades no município de Valença em 2010.	<b>23</b>
<b>TABELA 2-</b> Ordem cronológica dos eventos e óbitos ocorridos na <i>Propriedade D</i> .	<b>32</b>
<b>TABELA 3-</b> Dados epidemiológicos do surto 2 no município de Paty do Alferes em 2011.	<b>32</b>
<b>TABELA 4-</b> Cronologia dos óbitos a partir da chegada do carregamento de cevada e do início dos sinais clínicos na <i>Propriedade E</i> .	<b>35</b>
<b>TABELA 5-</b> Evolução clínica e desfecho dos animais da <i>Propriedade E</i> , envolvidos no surto 3.	<b>35</b>
<b>TABELA 6-</b> Dados epidemiológicos do surto 3 no município de Valença em 2012.	<b>36</b>
<b>TABELA 7-</b> Dados epidemiológicos do surto 4 no município de Barra Mansa em 2016.	<b>42</b>
<b>TABELA 8-</b> Dados de evolução clínica e desfecho dos animais da <i>Propriedade F</i> , envolvidos no surto 4.	<b>43</b>
<b>TABELA 9-</b> Dados epidemiológicos comparativos entre os surtos estudados- percentuais de morbidade, mortalidade e letalidade.	<b>43</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>03</b>
2.1 Processamento e formação de subprodutos de cervejaria	03
2.2 Toxicose por <i>Aspergillus clavatus</i> (TAC)	04
2.2.1 Aspectos gerais e produção de micotoxinas	04
2.2.2 Sinais clínicos e aspectos epidemiológicos	06
2.2.3 Patologia	08
2.2.4 Patogênese	10
2.3 Enfermidades a serem consideradas no diagnóstico diferencial da TAC	10
2.3.1 Enfermidades diretamente associadas à ingestão de subprodutos de cervejaria	11
2.3.1.1 Intoxicação por álcool etílico contido em “levedo” de cerveja	11
2.3.1.2 Acidose ruminal	12
2.3.1.3 Botulismo	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.</b>	<b>15</b>
3.1 Colheita de dados	15
3.2 Reprodução experimental	15
3.3 Processamento dos tecidos	16
3.3.1 Microscopia, imunoistoquímica e lectinahistoquímica	16
3.4 Exames micológicos e micotoxicológicos	17
3.4.1 Isolamento e identificação de <i>Aspergillus clavatus</i>	17
3.5 Exames complementares	18
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>19</b>
4.1 Dados clínico-epidemiológicos	19
4.2 Macroscopia	44
4.3 Microscopia	48
4.4 Lectina-histoquímica e imuno-histoquímica	63
4.5 Micologia e Micotoxicologia	63
4.6 Exames complementares	66

4.7 Reprodução experimental	66
4.7.1 Macroscopia e microscopia	68
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>78</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>79</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

O relevante crescimento da produção cervejeira nacional, nos últimos anos, elevou o Brasil a um patamar histórico: atualmente, o país é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, com uma produção anual estimada em 13 bilhões de litros. Esse aumento na produção fomentou a instalação de grandes empresas do setor cervejeiro, com farta oferta de subprodutos oriundos do processo de fabricação, sobretudo o bagaço de malte ou de cevada.

Dessa forma, em algumas regiões, o uso de subprodutos agroindustriais na alimentação animal assume papel econômico estratégico e, muitas vezes, pode ser responsável não só pela viabilidade econômica do sistema, como também pela redução do impacto ambiental, tendo em vista sua adequada destinação. Em decorrência da *disponibilidade*, do bom *valor nutricional* e do *baixo custo*, esses resíduos têm sido amplamente utilizados na alimentação de bovinos leiteiros no Brasil, constituindo-se também numa alternativa suplementar economicamente interessante, em especial, durante a escassez de pasto.

Por outro lado, o consumo de subprodutos de cervejarias e destilarias contaminados pelo fungo *Aspergillus clavatus* tem sido associado a uma doença neurológica de bovinos e ovinos em diversos países (KELLERMAN et al., 1976, 1984, 2005; GILMOUR et al., 1989, SABATER-VILAR et al., 2004). No Brasil, o diagnóstico desta enfermidade foi feito por Loretto et al. (2003) e Bezerra Júnior et al. (2009) mais especificamente no Rio Grande do Sul.

Os sinais clínicos dessa condição, predominantemente proprioceptivos e locomotores, incluem tremores musculares, hiperestesia, incoordenação dos membros pélvicos, paresia e paralisia progressivas e apoio sobre as articulações metacarpofalangeanas e metacarpotarseanas (boletos). Esses distúrbios frequentemente são exacerbados pelo exercício que, em geral, desencadeia quedas. Descrevem-se ainda, variáveis morbidade e mortalidade nos rebanhos afetados.

Recentemente verificaram-se quatro surtos de enfermidade neurológica em bovinos leiteiros, em estabelecimentos rurais do Estado do Rio de Janeiro. A informação inicial de que, em todas as propriedades, os bovinos ingeriam cevada, poderia justificar o aparecimento da sintomatologia nervosa observada. O exame histológico realizado no encéfalo de um desses animais, de fato, revelou lesões

compatíveis com as da toxicose por *A. clavatus*. Além disso, através do exame direto realizado em uma amostra de cevada colhida em uma das propriedades, também verificou-se a contaminação por fungos do gênero *Aspergillus*.

Esse estudo tem como objetivos caracterizar, da forma mais completa possível, a ocorrência dessa enfermidade no Estado do Rio de Janeiro, nos seus aspectos epidemiológicos, clínico-patológicos e patogenéticos, além de discutir os possíveis diagnósticos diferenciais e alertar para os eventuais riscos que o uso da “cevada” pode acarretar, quando o manejo de estocagem é inadequado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Processamento e formação de subprodutos de cervejaria

A cerveja é obtida a partir da fermentação do mosto de malte de cevada, sob a ação de leveduras, que converte os açúcares contidos nos grãos em álcool. Para a obtenção do malte, os grãos de cevada, previamente limpos e selecionados, são embebidos em água até que atinjam um teor de umidade de 45% em relação ao seu peso e sob condições controladas de temperatura e teor de oxigênio, dá-se início ao processo de germinação. Em fornos de secagem, este processo é então interrompido por injeção de vapor, tão logo sejam emitidas as primeiras brotações (radículas), o que aumenta a solubilidade do amido e permite a formação de enzimas fundamentais à fabricação da cerveja. Numa segunda fase, ainda nos fornos de secagem, promove-se a caramelização dos grãos, transformando-os em malte (SANTOS & RIBEIRO, 2005; OLIVEIRA, 2009).

Posteriormente, os grãos de malte são moídos e submetidos à maceração em água aquecida. Ao final deste processo obtém-se o mosto, que nada mais é do que uma solução de açúcares oriunda da sacarificação do amido presente no malte (e adjuntos) por ação de enzimas nele presentes. Após o preparo do mosto, este é resfriado e em seguida filtrado; a parte sólida retida é denominada *bagaço de malte* ou *dreche* e a parte líquida segue no processo de fabricação (SANTOS & RIBEIRO, 2005). Este resíduo, também chamado de *resíduo úmido de cervejaria* (RUC), *bagaço de cevada* ou *bagaço de malte*, pode ser comercializado sob a forma úmida (em torno de 14% MS), prensada (30% MS) ou seca (83 a 92% MS). A forma úmida, embora de transporte mais caro, representa um custo menor para a indústria e por isso é a mais comumente comercializada (CABRAL FILHO, 1999).

O *bagaço de malte*, constituído principalmente de restos de casca e polpa de cevada, além de outros grãos como arroz, milho e trigo, é quantitativamente o principal subproduto, com geração de 14 a 20 quilos a cada 100 litros de cerveja produzida. A grande produção anual de cerveja no país dá uma ideia da enorme quantidade deste subproduto gerada durante o processo industrial. O *bagaço de malte*, por sua vez, é um resíduo de alto valor nutritivo e, em grande parte das indústrias do setor, é enviado a outras empresas para uso em alimentação animal (SANTOS & RIBEIRO, 2005).

Devido ao seu perfil nutricional singular, com alto teor de fibras estruturais, energia e, em especial, proteínas, o bagaço de malte pode ser usado como principal ingrediente quando combinado com cereais, forragens e suplementos proteicos, na formulação de dietas para manutenção, lactação e crescimento de espécies ruminantes e não ruminantes (WESTENDORF & WOHLT, 2002)

No Estado do Rio de Janeiro, em função do grande número de indústrias cervejeiras, o uso de seus subprodutos na alimentação de bovinos tem sido uma prática comum, principalmente a utilização de cevada úmida e, mais recentemente, do “levedo” de cerveja, um líquido residual obtido após a fermentação do mosto (BRUST et al., 2015). Embora existam diversas vantagens na sua utilização, enfermidades como acidose ruminal (KROGH, 1963; AFONSO & MENDONÇA, 2007), laminite (OKWEE-ACAI & ACON, 2005), botulismo (STÖBER, 2005) e toxicose por *Aspergillus clavatus* (BEZERRA JÚNIOR, 2009a; KELLERMAN et al., 2005) tem sido associadas ao consumo de cevada úmida; adicionalmente também foi descrita a intoxicação por álcool etílico contido em “levedo” líquido de cerveja (BRUST, 2015).

## **2.2 Toxicose por *Aspergillus clavatus* (TAC)**

### **2.2.1 Aspectos gerais e produção de micotoxinas**

*Aspergillus clavatus* é um fungo saprófita cosmopolita que pode ser isolado de amostras de solo, fezes e materiais vegetais em decomposição. Embora considerado um contaminante relativamente raro de cereais e seus subprodutos, sob condições favoráveis para o seu crescimento, o fungo pode proliferar e produzir toxinas. Isso tende a ocorrer em produtos estocados com alto teor de umidade (LOPEZ-DIAZ & FLANNIGAN, 1997; VARGA et al., 2003) e, particularmente, em temperaturas superiores a 13°C, com intenso crescimento a 25°C (LOPEZ-DIAZ & FLANNIGAN, 1997).

O consumo de subprodutos de cervejarias e destilarias contaminados por *Aspergillus clavatus* tem sido associado a uma doença neurológica em bovinos e ovinos em alguns países, como na África do Sul, Inglaterra, Bélgica, Austrália (KELLERMAN et al., 1976, 1984; GILMOUR et al., 1989; SABATER-VILAR et al., 2004; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; KELLERMAN et al., 2005), inclusive no Brasil (LORETTI et al., 2003; BEZERRA JÚNIOR et al., 2009a,b) e foi reproduzida através da

administração de milho contaminado com fungo a bovinos (COLODEL et al., 2004) e subprodutos de cervejaria ou cultura fúngica a ovinos (LORETTI et al., 2003; BEZERRA JÚNIOR et al., 2009b).

Surtos de intoxicação por *A. clavatus* têm sido relatados em bovinos que ingeriram brotos de trigo (KELLERMAN et al., 1988), radículas de malte (GILMOUR et al., 1989), brotos de cevada (SHLOSBERG et al., 1991), brotos de milho (KELLERMAN et al., 1984) e resíduos de cerveja de sorgo (KELLERMAN et al., 1976). Cerveja de sorgo é uma bebida tradicional da África do Sul e resíduos oriundos desta fabricação por vezes são utilizados para suplementar a alimentação animal (KELLERMAN et al., 1988).

*Aspergillus clavatus* também foi considerado responsável por uma alveolite alérgica extrínseca em humanos, conhecida como “pulmão do trabalhador de malteria” e em casos de micotoxicoses em animais alimentados com subprodutos da maltagem (GRANT et al., 1976; FLANNIGAN & PEARCE, 1994; LOPEZ-DIAZ & FLANNIGAN, 1997).

A participação de diferentes micotoxinas isoladas de *A. clavatus* e envolvidas nessa doença ainda não está esclarecida (MCKENZIE et al., 2004). Várias substâncias têm sido identificadas em culturas e materiais contaminados por *A. clavatus* como patulina, brefeldina A e diversas toxinas tremorgênicas (DEMAIN et al., 1976; KELLERMAN et al., 1976, 1984; VARGA et al., 2003, 2007; SABATER-VILAR et al., 2004) foram listadas no *Quadro 1*. Embora nenhuma dessas substâncias tenha sido testada em ruminantes para determinar a patogênese da doença (MCKENZIE et al., 2004), especula-se que a enfermidade possa resultar da ação sinérgica de várias destas micotoxinas (VARGA et al., 2003).

O isolamento de *A. clavatus* de alimentos contaminados, por si só, não é suficiente para estabelecer o diagnóstico (LORETTI et al., 2003), pois certas cepas de *A. clavatus* não são toxigênicas (VARGA et al., 2003), contudo as lesões histológicas são consideradas características (KELLERMAN et al., 2005). A detecção de micotoxinas reforça o diagnóstico, no entanto, como as toxinas responsáveis pela doença não estão estabelecidas (MCKENZIE et al., 2004), sua simples presença também não é conclusiva. Reproduções experimentais da neurotoxicose têm sido realizadas em bovinos e ovinos para estabelecer a relação da doença com os alimentos contaminados e o fungo (KELLERMAN et al., 1976, 1984; GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004; BEZERRA JÚNIOR et al., 2009b).

Quadro 1- Micotoxinas identificadas em culturas e materiais contaminados por *A. clavatus* e seus efeitos.

<b>Micotoxinas</b>	<b>Efeitos</b>	<b>Referência</b>
Patulina	Citotóxicos	Lopez-Diaz et al., 1997; Sabater-Vilar et al., 2004; Varga et al., 2007.
Brefeldina A	Neurotóxicos, por apoptose celular	Wang et al., 2002;
Citocalasina E e K	Necrose celular. Inibem a clivagem em cultura de células animais, levando à formação de células gigantes multinucleadas e células sem núcleos. Atividade anti-angiogênica	Demain et al., 1976; Lopez-Diaz & Flannigan., 1997; Varga et al., 2007; Qiao et al., 2011.
Ascladiol	Citotóxicos	Suzuki et al., 1971.
Clavatul	Citotóxicos	Gniadek et al., 2012
Ácido Kójico	Citotóxicos	Gniadek et al., 2012
Triptoquivalona	Tremorgênicos	Büchi et al., 1977.
Nortriptoquivalona	Tremorgênicos	Büchi et al., 1977.
Triptoquivalina	Tremorgênicos	Büchi et al., 1977.
Gliantripina	Tremorgênicos	Demain et al., 1976
Ribotoxinas	Citotóxicos. Inibição da síntese de proteínas e consequente morte celular por apoptose	Varga & Samson, 2008; Varga et al., 2007.

### **2.2.2 Sinais clínicos e aspectos epidemiológicos**

Os *sinais clínicos* descritos em bovinos são predominantemente proprioceptivos/locomotores e, em geral, incluem fraqueza muscular, tremores musculares de intensidade variável, hiperestesia, membros pélvicos com hipermetria, ataxia, paresia e paralisia progressivas, e apoio sobre os boletos (BEZERRA JUNIOR et al., 2009a). Alguns animais podem assumir a posição de cão sentado ou ficar em decúbito esternal, com membros posicionados de forma anormal (KELLERMAN et al., 1976, 1984, 2005;

VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; SABATER-VILAR et al., 2004). Em adição, foram descritos postura com membros abertos em base ampla, tremores de cabeça, perda dos reflexos espinhal (LORETTI et al., 2003) e cutâneo (BEZERRA JUNIOR et al., 2009a), além de comportamento anormal como mania (GILMOUR et al., 1989), inquietação e reações de medo a sombras, objetos e animais (COLODEL et al., 2004).

Os distúrbios locomotores são intensificados pelo exercício (KELLERMAN et al., 1984, 2005; VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004; BEZERRA JÚNIOR, 2009a) que, em geral, desencadeia quedas (KELLERMAN et al., 1976, 1984, 2005; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; MCKENZIE et al., 2004; SABATER-VILAR et al., 2004; BEZERRA JÚNIOR, 2009a). A movimentação ainda pode precipitar rápido cansaço, dificuldade respiratória (KELLERMAN et al., 1984, 2005; GILMOUR et al., 1989; EL-HAGE & LANCASTER, 2004) e salivação (KELLERMAN et al., 1984, 2005; LORETTI et al., 2003; EL-HAGE & LANCASTER, 2004).

Há também marcada queda na produção leiteira, embora o apetite e a dipsia permaneçam relativamente normais até pouco antes da morte ou da eutanásia (BEZERRA JÚNIOR, 2009a). Em alguns surtos, porém, relata-se anorexia (GILMOUR et al., 1989; KELLERMAN et al., 2005). Alguns animais sobreviventes podem permanecer com sinais locomotores constantes (KELLERMAN et al., 1976; GILMOUR et al., 1989; BEZERRA JÚNIOR et al., 2009a).

A *morbidade* entre os surtos varia desde 17% até 100% (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; BEZERRA JÚNIOR, 2009a) e a *letalidade*, incluindo animais mortos espontaneamente e eutanasiados, também oscila com valores entre 31 e 100% (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; BEZERRA JÚNIOR, 2009a).

Em experimentos, a doença foi reproduzida em bovinos alimentados com milho triturado, contaminado com *A. clavatus*. Os sinais clínicos, com início variando entre 5 e 16 dias após a ingestão eram caracterizados por tremores musculares, sobretudo nos membros, cabeça e pescoço, que se acentuavam após a movimentação. Com a evolução do quadro clínico, ocorreu hiperexcitabilidade, com reações exageradas ao toque, aos sons e para caminhar em terrenos irregulares. Os animais permaneciam em atitude de

alerta, caracterizada por olhos “vidrados” e orelhas eretas. Quando movimentados, os animais afetados apresentavam incoordenação com dismetria e instabilidade, principalmente, nos membros pélvicos. Observou-se ainda, tetania com marcha em pequenos saltos, quedas frequentes, por vezes com abdução dos membros. Os animais apresentavam dificuldade para levantar e quando conseguiam, ficavam em posição de cavalete, com tremores musculares generalizados (COLODEL et al., 2004).

Os sinais clínicos observados em ovinos são bastante semelhantes aos citados em bovinos. São descritos hiperestesia e tremores musculares progressivos, caminhar com passos curtos arrastando os membros pélvicos (KELLERMAN et al., 1976, 1984) apoiados sobre os boletos (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989) ou com membros pélvicos rígidos (GILMOUR et al., 1989), com evolução para decúbito esternal (KELLERMAN et al., 1976, 1984; GILMOUR et al., 1989), com membros dispostos de forma anormal (KELLERMAN et al., 1984). Respiração ofegante (KELLERMAN et al., 1976; GILMOUR et al., 1989) e anorexia (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989) são também descritos.

Em trabalhos experimentais com ovinos, os sinais clínicos foram observados entre 2 e 13 dias após a alimentação com resíduo de cervejaria contaminado e a morte ou eutanásia ocorreu entre 36 horas e 12 dias após o início dos sinais clínicos (KELLERMAN et al., 1976, 1984; BEZERRA JÚNIOR, 2009b). Em alguns experimentos com ovinos, no entanto, pode-se não perceber ou não haver sinais clínicos após semanas de ingestão do resíduo, embora os animais apresentem lesões no sistema nervoso (GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003).

### **2.2.3 Patologia**

À necropsia, verificam-se áreas branco-acinzentadas em grandes massas musculares nos membros pélvicos e torácicos, particularmente nas proximidades das inserções e das origens. Menos comumente, os músculos podem estar difusamente pálidos (KELLERMAN et al., 1976, 2005; VAN DER LUGT et al., 2002; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004; BEZERRA JÚNIOR, 2009a). São descritos ainda edema entre as fáscias musculares (KELLERMAN et al., 1976; BEZERRA JÚNIOR, 2009a) e petéquias, mais evidentes ao longo dos grandes nervos como o isquiático e o braquial (KELLERMAN et al., 1976). Não há lesões significativas no sistema nervoso,

com exceção de congestão nas meninges observada em alguns animais (KELLERMAN et al., 2005).

As *alterações macroscópicas*, em geral, são mais proeminentes em bovinos clinicamente muito afetados e que apresentam sintomas por longos períodos (KELLERMAN et al., 1976, 2005), mas não são observadas em alguns surtos (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; MCKENZIE et al., 2004). Os músculos afetados incluem o gastrocnêmio, semimembranáceo, semitendíneo, reto femoral, quadríceps, adutor, pectíneo, sartório, serrátil ventral, grácil, íleo-psoas, peitoral, músculos esternais e extensores dos membros torácicos. Alguns animais que sobrevivem por longos períodos podem apresentar pequenos focos pálidos de necrose no miocárdio - músculo papilar e parede do ventrículo esquerdo (KELLERMAN et al., 1976, 2005).

As *alterações histológicas* mais significativas são degeneração, vacuolização e necrose cromatolítica de grandes neurônios, especialmente dos cornos ventrais da medula espinhal e alguns núcleos da medula oblonga, mesencéfalo e tálamo (KELLERMAN et al., 1976, 1984; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994, 2002; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; MCKENZIE et al., 2004; SABATER-VILAR et al., 2004; BEZERRA JÚNIOR et al., 2009a), além dos gânglios nervosos (espinhal, trigêmeo, estrelado e celíaco). As lesões, muitas vezes, apresentam-se bilaterais e relativamente simétricas. No tronco cerebral, os núcleos nervosos mais afetados são o vermelho (rubro), os vestibulares, o motor dorsal do nervo vago, o ambíguo e a formação reticular da ponte (BEZERRA JÚNIOR et al., 2009a). Os neurônios acometidos encontram-se tumefeitos e, em várias instâncias, revelam diferentes estágios de cromatólise, caracterizada por citoplasma eosinofílico, pálido e com grânulos de Nissl rarefeitos ou ausentes. Muitos dos núcleos de neurônios degenerados ou necróticos encontram-se situados excêntricamente e estão picnóticos, apagados ou ausentes. Ocasionalmente pequenos vacúolos citoplasmáticos podem ser vistos em vários neurônios afetados (COLODEL et al., 2004).

As lesões nos músculos esqueléticos são caracterizadas por degeneração e necrose hialina (KELLERMAN et al., 1976; VAN DER LUGT et al., 2002; LORETTI et al., 2003; BEZERRA JÚNIOR, 2009a), por vezes acompanhada de mineralização distrófica (LORETTI et al., 2003; BEZERRA JÚNIOR, 2009a). Em casos crônicos, podem ocorrer degeneração e necrose de miofibras no miocárdio (KELLERMAN et al.,

1976), contudo, em alguns surtos essas lesões não tem sido descritas (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; BEZERRA JÚNIOR, 2009a).

Vários nervos periféricos podem ser afetados, incluindo nervos espinhais, isquiáticos, femorais, fibulares, obturadores, radiais e plexos braquiais (SABATER-VILAR et al., 2004). Bezerra Júnior et al.(2009a) descreveram degeneração walleriana nos funículos dorsais da medula espinhal e nervos isquiático e fibular.

#### **2.2.4 Patogênese**

A *patogênese* das lesões neurológicas não está completamente esclarecida. Tem sido sugerido que a cromatólise seja a manifestação de uma agressão primária ao corpo do neurônio (KELLERMAN et al., 1976; 1984; VAN DER LUGT et al., 2002; LORETTI et al., 2003). Neste sentido, a degeneração axonal, observada em alguns casos, seria secundária ou concomitante (VAN DER LUGT et al., 2002). Alguns autores propõem que as lesões podem ser explicadas por uma lesão axonal primária e que as lesões observadas em corpos de neurônios sejam secundárias e definidas como reação à lesão axonal (GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; SABATER-VILAR et al., 2004). Um processo de axonopatia distal também tem sido proposto (VAN DER LUGT et al., 1994).

A patogênese das lesões musculares também não está elucidada (GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003). Vários mecanismos atuando isoladamente ou em conjunto podem estar envolvidos, como isquemia associada ao decúbito, eventos traumáticos, contrações musculares vigorosas (LORETTI et al., 2003). Tem sido sugerido também que metabólitos de *A. clavatus* possam ter efeitos neurotóxicos e miotóxicos (GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003).

As variações no quadro clinico-patológico são atribuídas a diferenças nas micotoxinas produzidas ou às quantidades das mesmas nos diferentes surtos (GILMOUR et al., 1989).

### **2.3 Enfermidades a serem consideradas no diagnóstico diferencial da TAC**

O diagnóstico diferencial da toxicose por *A. clavatus* deve incluir, principalmente, enfermidades que causam alterações semelhantes (Anexo 1), relativas

ao SNC e ao sistema músculo esquelético (LORETTI et al., 2003; BARROS et al., 2006; RIET-CORREA et al., 2007; BRUST, 2011).

### **2.3.1 Enfermidades diretamente associadas à ingestão de subprodutos de cervejaria**

#### **2.3.1.1 Intoxicação por álcool etílico contido em “levedo” de cerveja**

A administração de “levedo” de cerveja a bovinos tem sido associada a casos esporádicos, por vezes fatais, de intoxicação por etanol no Sul do Estado do Rio de Janeiro (BRUST, 2011; PEIXOTO et al., 2011).

O resíduo é utilizado, na maioria dos casos, em criações de gado de corte e, eventualmente, em explorações leiteiras. Os surtos ocorrem mais em animais pouco habituados ao consumo, de forma que, no início, tendem a ingeri-lo em grandes volumes. O “levedo”, quando recém-chegado às propriedades, parece conter níveis mais elevados de álcool, o que contribuiria para a intoxicação até mesmo nos lotes já habituados ao consumo, mas principalmente, naqueles em fase de adaptação. Outrossim, períodos que se seguem à escassez do produto parecem estimular um maior consumo do resíduo e conseqüentemente, predispor à intoxicação (BRUST, 2011).

O quadro clínico inicia-se em até 30 minutos após o término da ingestão de grandes quantidades de “levedo” de cerveja e se caracteriza por sinais de embriaguez com tontura, cambaleios, quedas, posições atípicas, decúbito, timpanismo e morte em minutos ou poucas horas, principalmente devido ao meteorismo. Ataxia, decúbito, incapacidade de levantar-se, obnubilação, tremores musculares, respiração profunda e taquipneica também foram observados em um bovino que se recuperou. Relataram-se ainda, choque contra obstáculos, sonolência, movimentos pendulares com a cabeça, apoio da cabeça ao solo, taquicardia, nistagmo e odor alcoólico do ar expirado (BRUST, 2011).

Relatos sobre alterações macro e microscópicas em animais intoxicados por etanol são escassos. Em bovinos, mencionam-se odor etílico característico no conteúdo ruminal, por vezes, abomasite acompanhada por hemorragia na mucosa e na subserosa, congestão do encéfalo e em órgãos parenquimatosos (STÖBER, 2005).

Os achados de necropsia relatados por Brust (2011), verificados após a administração de “levedo” de cerveja a bovinos, limitaram-se a um único animal e

foram descritos como um edema gelatinoso e translúcido na parede do rúmen, conteúdo ruminal com odor característico de “levedo” de cerveja e espuma esbranquiçada na traqueia.

### 2.3.1.2 Acidose ruminal

A acidose ruminal láctica em ruminantes é determinada pela ingestão de grandes quantidades de alimentos ricos em carboidratos de fácil fermentação (UNDERWOOD, 1992a), resultando em excessivo acúmulo de ácidos orgânicos no rúmen, redução do pH ruminal e produção de fatores tóxicos (SLYTER, 1976). Entre os alimentos mais implicados na acidose estão os cereais moídos como trigo, *cevada*, aveia, centeio e milho, frutas, tubérculos, melão, farelo de grãos (UNDERWOOD, 1992a), pães e seus subprodutos (DIRKSEN, 2005) ou *resíduos de cervejaria* (AFONSO & MENDONÇA, 2007; KROGH, 1963). Grãos submetidos ao vapor, esmagamento, moagem e outros processamentos para a fabricação de ração podem aumentar a disponibilidade de amido para a fermentação ruminal e agravar os riscos da doença (ELAM, 1976).

Quadros de acidose ruminal causados pela ingestão de *grãos de cervejaria* foram relatados por Krogh (1963).

Referências sobre a incidência da enfermidade pela *ingestão de bagaço de malte* no Brasil são escassas, no entanto, seu uso indiscriminado na dieta de ruminantes tem sido responsável por casos de acidose ruminal e laminite no Estado do Rio de Janeiro (CALDAS; 2011).

As manifestações clínicas da acidose ruminal são altamente variáveis de acordo com o tipo e quantidade de alimento ingerido, o intervalo de tempo decorrido desde o consumo do alimento (UNDERWOOD, 1992a), a fase da enfermidade, o grau de acidose e com as modificações locais reabsortivas resultantes (DIRKSEN, 1981).

Em casos de *acidose ruminal aguda*, os sintomas têm início 8h após a ingestão excessiva de carboidratos (UNDERWOOD, 1992b) e evidenciam-se em 12 a 24 horas (DIRKSEN, 2005) por inapetência (DIRKSEN, 1981), anorexia (KROGH, 1963; UNDERWOOD, 1992b), incoordenação (DIRKSEN, 1981, UNDERWOOD, 1992b) letargia (KROGH, 1963), intranquilidade, tremores musculares, sinais de cólica, gemidos, ranger de dentes (DIRKSEN, 1981) e queda ou interrupção da produção leiteira (DIRKSEN, 2005; KROGH, 1963); alguns animais tornam-se extremamente

deprimidos e permanecem deitados (DIRKSEN, 1981; KROGH, 1963; UNDERWOOD, 1992a).

Em quadros graves, os animais podem ser encontrados em decúbito esternal com a cabeça voltada para o flanco, apresentando-se apáticos e comatosos, com enoftalmia, temperatura subnormal, frequência cardíaca elevada e dispnéia (DIRKSEN, 2005). Sem tratamento a morte pode sobrevir em até 12 horas (DIRKSEN, 2005; UNDERWOOD, 1992a). Animais sobreviventes podem apresentar complicações como rumenite e abscessos hepáticos (BRENT, 1976; UNDERWOOD, 1992b), além de laminite e polioencefalomalácia (BRENT, 1976).

As lesões macro e microscópicas em animais com acidose ruminal aguda, de uma forma geral, se resumem a um conteúdo líquido e ácido nos pré-estômagos e intestino, além de papilas ruminais friáveis que se desprendem facilmente da camada inferior, especialmente no saco ventral. Degeneração hidrópica e necrose coagulativa do epitélio ruminal são acompanhadas por influxo de neutrófilos; geralmente o fígado revela múltiplos abscessos (GELBERG, 2007).

### **2.3.1.3 Botulismo**

O botulismo é uma enfermidade específica, não febril, causada pela ingestão da neurotoxina do *Clostridium botulinum*, um bacilo anaeróbico que, sob a forma de esporo, é encontrado tanto no solo quanto na água. No total, há 7 tipos de toxinas botulínicas classificados entre A e G, mas somente os tipos C e D estão comumente associados aos surtos em bovinos, com raras participações do tipo B (STÖBER, 2005).

Casos de botulismo em bovinos estão associados à ingestão de feno, silagem, concentrado ou água, impregnados pela toxina botulínica, produzida em decorrência da contaminação destes alimentos com restos ou líquidos cadavéricos de animais como aves, ratos ou gatos. O consumo de *bagaço de malte de cervejaria*, silagem ou feno, armazenados de forma incorreta, pode servir como fonte de intoxicação, muitas vezes, com a participação da toxina botulínica tipo B (STÖBER, 2005). Nestes casos, a elevada umidade, o pH acima de 4,5 e condições de anaerobiose permitem o crescimento de *C. botulinum* (RADOSTITS et al., 2002).

No Brasil, o botulismo é uma importante causa de morte em bovinos e a osteofagia, associada à deficiência de fósforo, sua principal condição predisponente (TOKARNIA et al., 1970, 2010).

Os sintomas variam conforme a quantidade e o tipo de toxina ingerida (STÖBER, 2005). De uma forma geral, caracterizam-se por distúrbios de ordem neuromuscular, que incluem paralisia dos músculos da locomoção, apreensão de alimentos, mastigação e deglutição. Inicialmente, o animal deixa de acompanhar o rebanho, apresenta andar rígido, poliflexão dos membros e emboletamento (DUTRA et al., 2005), dificuldade em manter-se em estação, tendência acentuada a se deitar, dificuldade em levantar-se e por fim, decúbito esterno-abdominal permanente (TOKARNIA et al., 1970; 2010). A cabeça encontra-se em posição anormal apoiada ao solo ou fletida em direção ao flanco (STÖBER, 2005).

Casos de botulismo tipo B, associados ao *consumo de cevada* ou silagem de capim, caracterizam-se por intranquilidade, incapacidade de deglutir, língua flácida e parcialmente paralisada, sialorreia intensa, tosse e regurgitação de saliva, água e conteúdo ruminal pela boca e narinas. A capacidade de movimentação encontra-se apenas restrita, em geral, com o lombo arqueado e o tônus da cauda reduzido. A morte nestes casos ocorre em até uma semana devido à desidratação e pneumonia por falsa via (STÖBER, 2005) Na Holanda, surtos de botulismo foram diagnosticados em 20 propriedades rurais que utilizavam *cevada úmida* na dieta dos animais. O quadro clínico caracterizou-se por marcada alteração na ingestão e deglutição de alimentos, particularmente, por salivação e regurgitação, além de ausência de distúrbios locomotores, mesmo nos casos de longa evolução (HAAGSMA; LAAK, 1978).

Animais com botulismo não demonstram quaisquer alterações macro ou microscópicas dignas de nota, entretanto, nos casos associados à deficiência de fósforo, podem ser encontradas eventuais alterações no esqueleto e fragmentos de ossos ou cadáveres no rúmen e retículo (TOKARNIA et al., 1970, 2010).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Colheita de dados**

O levantamento do histórico e dos dados clínico-epidemiológicos dos surtos foi obtido durante visitas às propriedades, junto aos proprietários e funcionários.

Nas propriedades A, B e C, envolvidas no surto 1 e localizadas no município de Valença, três bovinos foram submetidos à eutanásia e necropsia, dois pertencentes à propriedade B e um à propriedade C.

Na propriedade D, localizada no município de Paty do Alferes, foram necropsiados três bovinos; dois encontrados mortos e outro, após eutanásia.

Na propriedade E, localizada no município de Valença, localidade de Pedro Carlos, pertencente ao distrito de Conservatória, foi necropsiado um bovino encontrado morto.

Na propriedade F, localizada no distrito de Nossa Senhora do Amparo, pertencente ao município de Barra Mansa, foram necropsiados três bovinos, dois que morreram no momento da nossa visita e um encontrado morto.

Em todos os animais submetidos à eutanásia utilizou-se tiopental sódico, já em fase agônica.

#### **3.2 Reprodução experimental:**

A reprodução experimental em ovinos foi realizada primeiramente em uma propriedade rural em Lavras-MG. Para um ovino foram administrados 40g/kg por dia de cevada contaminada coletada na *Propriedade D*. A administração do subproduto foi feita via oral com uma seringa de 60 mL e mantida até o aparecimento dos sinais clínicos da enfermidade. Posteriormente, realizou-se outro experimento a campo com um ovino, macho, da raça Santa Inês, de 5 meses de idade. Utilizou-se a cevada coletada na *Propriedade F* e a proporção de 40g/kg por dia do experimento anterior foi

mantida. A administração do subproduto, parcialmente diluído em água, foi feita via oral, com auxílio de sonda de 1,5 cm de diâmetro, adaptada a um funil e mantida até o aparecimento dos sinais clínicos da enfermidade. Para a diluição, foram utilizados 100g de cevada para cada 140 mL de água.

### **3.3 Processamento dos tecidos**

#### **3.3.1 Microscopia, imuno-histoquímica e lectina-histoquímica**

Os fragmentos de diversos tecidos destinados à microscopia óptica foram fixados em formalina a 10% tamponada, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram corados pela hematoxilina e eosina e pelos métodos de violeta de cresil e azul rápido de luxol (PROPHET et al., 1992). Do sistema nervoso dos animais foram colhidos encéfalo, medula espinhal, gânglios nervosos (trigeminais). Amostras do sistema nervoso central incluíram cortes da medula oblonga ao nível do óbex, ponte com pedúnculos cerebelares, córtex cerebelar, mesencéfalo ao nível dos colículos rostrais, tálamo, córtex cerebral e medula espinhal ao nível torácico e das intumescências lombar e cervical. Foram avaliados ainda fragmentos dos seguintes órgãos: fígado, baço, rim, linfonodos, tireóide, rúmen, além de amostras de músculos dos membros pélvicos, membros torácicos, axiais (longíssimo dorsal e psoas) e cardíaco dos animais. Todo o material foi processado no Laboratório Global Vet - Diagnóstico Anátomo-Patológico em Seropédica-RJ.

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica foram feitos cortes histológicos de 5 µm de espessura, depois aplicados em lâminas de vidro recobertas com solução de gelatina 0,3% e fixados em estufa a 60°C durante 24 horas.

O exame de imuno-histoquímica para o diagnóstico diferencial da encefalopatia espongiiforme bovina (EEB) foi realizado pelo Laboratório Nacional Agropecuário do de Pernambuco, no Recife (LANAGRO-PE).

Para a realização da técnica de lectina-histoquímica, seções histológicas do sistema nervoso foram desparafinadas, hidratadas, e incubadas por 30 minutos em peróxido de hidrogênio a 3% para bloqueio de peroxidases endógenas. Após a lavagem das lâminas por dois minutos com água destilada, estas ficaram submersas em tampão citrato (pH 6,0), por 15 minutos a 96° C em banho-maria. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com leite desnatado a 5 % (Molico® - Indústria Brasileira) durante 30 minutos. Os cortes foram incubados “overnight” com lectinas (Vector Laboratories, Burlingame, Califórnia, 94010, USA) na diluição de 5µg/mL em PBS, com exceção das lectinas Con A, que foi diluída na proporção de 0,5µg/ml e da lectina RCA, que foi diluída na proporção de 1µg/ml. Foram utilizadas as lectinas *Canavalia ensiformis* agglutinin (**Con-A**; a-d-Man; a-d-Glc-specific), *Dolichos biflorus* agglutinin (**DBA**; a-d-Gal-Nac-specific), *Glycine max* agglutinin (**SBA**; a-d-GalNac; b-Gal-specific), *Arachis hypogaea* agglutinin (**PNA**; b-d-Gal/(1-3) GalNac-specific), *Ricinus communis* agglutinin-I (**RCA-I**; b-d-Gal-specific), *Ulex europaeus* agglutinin-I (**UEA-1**; a-L-Fuc-specific), *Triticum vulgare* agglutinin (**WGA**; a-d-GlcNac/NeuNac-specific, Succinyl-WGA (**sWGA**), *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* (**GSL**), *Sophora japonica* (**SJA**), *Pisum sativum* (**PSA**), *Phaseolus vulgaris* (**PHA-L e PHA-E**), *Lens culinaris* ou *L. esculenta* (**LCA**) (Lectin Kit Biotinylated BK 1000 e 2000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Após o período de incubação, os cortes foram lavados por cinco minutos com tampão fosfato (PBS) e incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain, Vector Laboratories Inc.) por 30 minutos. Diaminobenzidina (DAB) foi o cromógeno utilizado e todas as seções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. Utilizou-se como controle negativo os mesmos cortes, porém substituiu-se as lectinas por PBS na incubação. A técnica foi executada no Laboratório de Anatomia Patológica e Histopatologia (Convênio - Projeto saúde Animal (PSA)-UFRRJ).

### **3.4 Exames micológicos e micotoxicológicos**

#### **3.4.1 Isolamento e identificação de *Aspergillus clavatus***

Amostras de cevada utilizada nas *Propriedades D e F* que apresentaram visível contaminação fúngica foram coletadas e enviadas para cultivo e identificação

micológica ao Laboratório de Biologia de Fungos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

A micobiota foi quantificada por unidade formadora de colônia (UFC). Os isolamentos foram feitos em 5g da amostra ressuspensa em 45 mL de 0,1% de peptona contendo 0,1% de Tween 80 em frasco Erlenmeyer, em seguida agitado por 30 min em homogeneizador de haste vertical a 150 rpm. O meio de cultura utilizado foi o Dicloran Rosa de Bengal Cloranfenicol (DRBC), realizado com alíquotas de 0,1mL das respectivas diluições ( $10^2$  a  $10^6$ ), transferidas para os tubos de cultura contendo 0,9 mL de meio de cultura. Posteriormente foi retirado 0,1 mL desta solução que, em seguida, foram plaqueados em forma de gotas, com 5 repetições para cada diluição, As placas de Petri foram incubadas em estufas a 25°C por 5 dias. A leitura baseou-se na presença ou ausência de UFC sobre cada gota. A identificação da micobiota baseou-se no estudo morfológico (macroscópico e microscópico). Foram utilizados meios específicos para cada grupo de fungo, conforme Klich (2002).

As análises micotoxicológicas foram realizadas no Laboratório de Micotoxicologia da Universidade Federal de Santa Maria.

### **3.5 Exames complementares**

Foram realizados hemograma completo de quatro bovinos, bioquímica sérica de quatro bovinos e um ovino e o teste de precipitação por sulfato de amônia para mioglobínúria de um bovino no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Dados clínico-epidemiológicos

Os surtos ocorreram em julho de 2010 (*Propriedades A, B e C*), agosto de 2011 (*Propriedade D*), outubro de 2012 (*Propriedade E*) e junho de 2016 (*Propriedade F*); nos municípios de Valença em 2010 e 2012, Paty do Alferes em 2011 e Barra Mansa em 2016.

No surto de 2010 (surto 1), três propriedades rurais próximas (A, B e C) utilizavam cevada oriunda de uma distribuidora localizada na cidade, como suplementação na alimentação dos animais. A cevada utilizada pelas referidas propriedades era estocada somente na *Propriedade A*, em um buraco no chão de aproximadamente, 2x4 m e 3,5 m altura, cujas paredes eram revestidas por bambu (Figura 1). Os surtos de intoxicação ocorreram praticamente no mesmo período, 20 a 31 dias após o início do consumo da cevada. A inspeção no local de armazenamento revelou grande quantidade de bolor cinza-esverdeado na superfície da cevada, parte com bolores semelhantes a algodão (Figura 2) e ainda, bolores de coloração acinzentada, em várias partes da parede de bambu (Figura 3 a, b). O proprietário informou que, enquanto utilizou a cevada na alimentação dos animais, ela não estava “embolorada”, o que veio a ocorrer após a suspensão do fornecimento. O primeiro carregamento de cevada durou aproximadamente 45-50 dias, sem que houvesse sobras, ou pelo menos, não em grande quantidade, antes da chegada de uma nova remessa. A alimentação dos animais das três propriedades era à base de capim picado, cana e cevada (8 a 10 kg/ animal/ dia) divididos em dois tratos.

Inicialmente a cevada era fornecida a 18 vacas na *Propriedade A*, até a venda de duas, uma para a *Propriedade B* e outra para a *Propriedade C*. Na *Propriedade A*, o primeiro animal (Bovino 1A) adoeceu 20 dias após o início do fornecimento da nova remessa de cevada. Os sinais clínicos, que perduraram por sete dias, eram caracterizados por “fraqueza” dos membros, incoordenação, principalmente dos membros pélvicos que estavam rígidos e com arrastar das pinças. Esse animal foi medicado com 3 litros de Stomivit® e ainda Fe, Ca e Mercepton®. Veio a óbito horas após a medicação.

Outras duas vacas (Bovinos 2A e 3A) adoeceram no dia seguinte da morte do Bovino 1A, apresentando tremores e membros pélvicos rígidos, porém mantendo-se alertas. Medicadas com Mercepton®, recuperaram-se. O fornecimento da cevada foi suspenso 11 dias após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos.



Figura 1- Local de armazenamento da cevada na *Propriedade A* com paredes revestidas de bambu e cobertura de lona.



Figura 2- Cevada da *Propriedade A* apresentando bolor de coloração branca com aspecto de “algodão”.



Figura 3-a Bolor de coloração cinza-esverdeada no fundo e 3-b acinzentado nas paredes de bambu no local de armazenamento da cevada na *Propriedade A*.

Na *Propriedade B* havia cinco animais no trato com cevada. Após 28 dias de ingestão, o primeiro animal (Bovino 4B) apresentou tremores, membros pélvicos

rígidos, andar com apoio sobre os boletos flexionados (“emboletamento”), por vezes, assustadiço com passos irregulares. Este animal foi eutanasiado e necropsiado sete dias após o início dos sinais clínicos, já em estado agônico. Outro animal (Bovino 5B) apresentou tremores e rigidez dos membros pélvicos 31 dias após o início do fornecimento da cevada, seguido por “emboletamento” dois dias após (Figura 4). Permanecia em decúbito esternal e quando tangido, apresentava muita dificuldade em erguer a região pélvica (tremores e fraqueza). Quando em decúbito esternal apresentava tremores no focinho, peito, paleta e períneo. Ao exame clínico, o tônus de língua apresentava-se sem alteração, assim como a sensibilidade cutânea dos membros pélvicos, ânus e cauda. O animal foi eutanasiado e em seguida, necropsiado 10 dias após o início dos sinais clínicos.

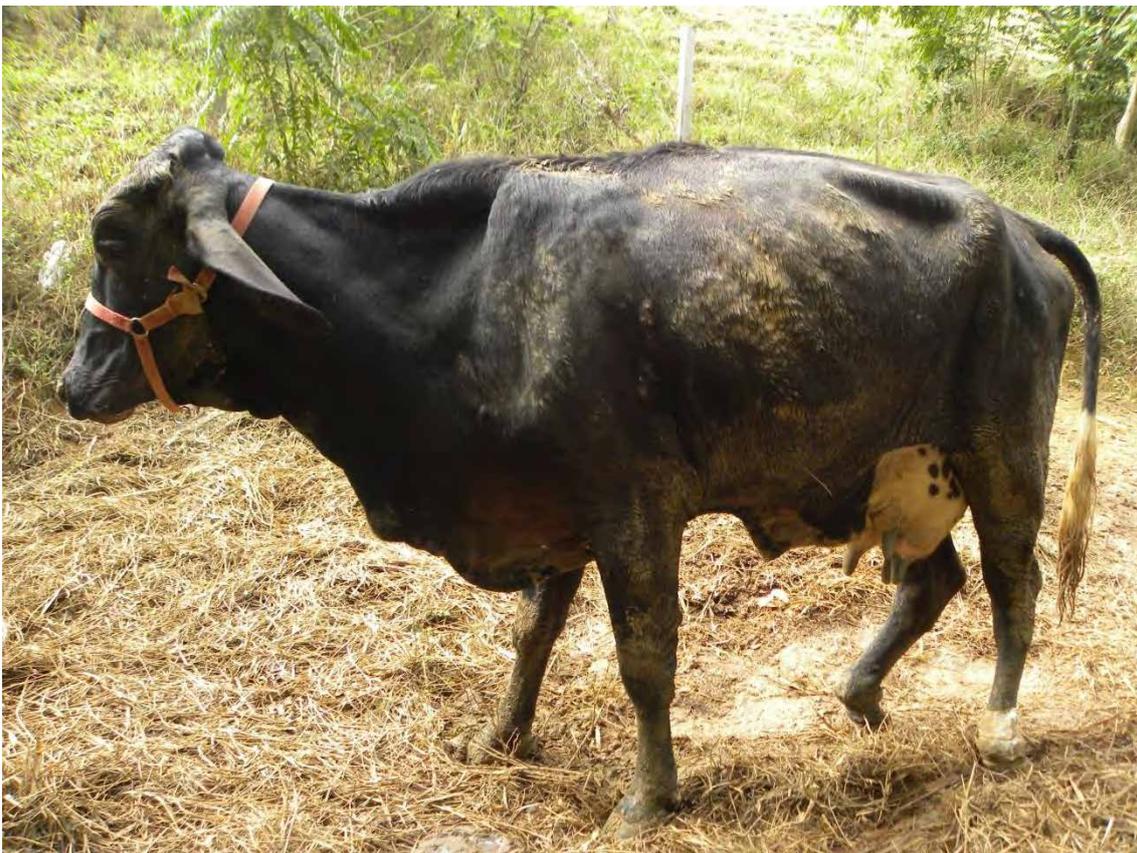


Figura 4- Neurotoxicose por *Aspergillus clavatus*. Propriedade B, Bovino 5 apoiando-se sobre os boletos dos membros pélvicos.

Na *Propriedade C*, com um rebanho de oito animais, cinco adoeceram e um morreu (Bovino 6C). Após 20 dias da ingestão de cevada, os primeiros sinais clínicos apresentados pelos animais eram de rigidez e hipermetria dos membros pélvicos, salivação, andar para trás, tremores musculares e hiperestesia. Um deles apresentava-se assustado, com orelhas eretas, olhos “vidrados”, assustando-se com a própria sombra e quando tangido, as quedas eram frequentes. O produtor também notou que as vacas entravam em cio – uma inclusive encontrava-se supostamente prenhe. Decorridos três dias, o Bovino 6 apresentou-se em decúbito lateral com opistótono e dois dias depois, foi sacrificado pelo proprietário, necessitando posteriormente, ser desenterrado para a colheita do encéfalo. Os dados epidemiológicos do surto 1, estão listados na Tabela 1.

Tabela 1- Dados epidemiológicos do surto 1 envolvendo três propriedades no município de Valença em 2010.

<b>Propriedades</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Início sinais clínicos (dias)	20-28	28-31	20
Evolução (dias)	7	7-10	5
Doentes	3	2	5
Óbitos	1	2	1
Necropsias	-	2	1

Na *Propriedade D* (surto 2), o histórico foi fornecido, principalmente, pelo tratador dos animais e confrontado com informações dos proprietários. Percebeu-se uma insatisfação do tratador em revelar corretamente as informações, não sendo preciso ou mostrando incoerência em algumas delas. Durante a primeira visita para o levantamento clínico-epidemiológico, somente foi possível observar e examinar alguns animais, pois não havia ninguém na propriedade. Até este dia, 11 vacas já haviam evoluído a óbito; informação obtida posteriormente.

Com rebanho leiteiro de 26 animais entre vacas e novilhas, os sinais clínicos foram observados oito dias após a chegada do carregamento de cevada, oriundo de uma distribuidora localizada no município vizinho de Miguel Pereira. A cevada era estocada em um tanque de alvenaria e fornecida aos animais sem que a camada superficial fosse retirada, mesmo quando o bolor era visível (Figuras 5 e 6).



Figura 5- Aspecto da cevada que restou armazenada no tanque da *Propriedade D*.  
Presença de bolor de coloração cinza-esverdeada na superfície da cevada.



Figura 6- Bolor na parede do tanque de armazenamento da cevada da *Propriedade D*.

Os animais apresentaram acentuada perda de peso, ataxia e tremores musculares, quando em repouso, mais pronunciados no trem posterior. Os mais afetados caminhavam sobre os boletos flexionados; apresentavam hiperestesia e frequentemente mostravam-se “assustadiços”. Alguns animais assumiam a posição de “cão sentado” e quando forçados a movimentarem-se, as quedas eram frequentes.

Durante a primeira visita, o Bovino 1D apresentou movimentos rígidos dos membros pélvicos com passos curtos e elevando os jarretes acentuadamente. Quando tangido, por vezes tropeçava, mas raramente “emboletava”. Quando se deitou, por iniciativa própria, mostrou dificuldade em se levantar, mas conseguiu com muito esforço. Por vezes ficava em estação, com os membros pélvicos deslocados mais caudalmente que o normal. Após oito dias, apresentou agravamento da incoordenação com “emboletamento” por várias vezes ao sustentar a pelve, flexionando os membros pélvicos, quase sentando e arrastando-se sobre os boletos, (Figuras 7a e 7b) com algumas quedas em um pequeno percurso (Figura 8). Após esse período, o animal apresentou melhora gradativa das alterações locomotoras, porém passados 120 dias da última visita, durante exame neurológico (Anexo 2), o andar discretamente rígido ainda era perceptível.



Figura 7 a, b- Neurotoxicose causada por *A. clavatus*. Propriedade D, Bovino 1. **a.** Animal após queda, levantando-se com abdução e flexão não usual do membro torácico esquerdo e “emboletamento” do membro pélvico direito, **b.** Animal em movimento, com dificuldade de elevar a região pélvica.



Figura 8- Neurotoxicose causada por *A. clavatus*. *Propriedade D*, Bovino 1. Animal em queda após movimentação forçada com membro pélvico “emboletado” e membros torácicos em posição atípica.

Alguns animais, como o Bovino 2D, apresentaram hipermetria dos membros torácicos (Figura 9) e pélvicos (Figura 10), dismetria e abdução exagerada dos membros torácicos (Figura 11) e “emboletamento” do membro pélvico direito (Figura 12).



Figura 9- Neurotoxicose por *A. clavatus*. *Propriedade D*, Bovino 2. Hipermetria dos membros torácicos com posição atípica durante a marcha.

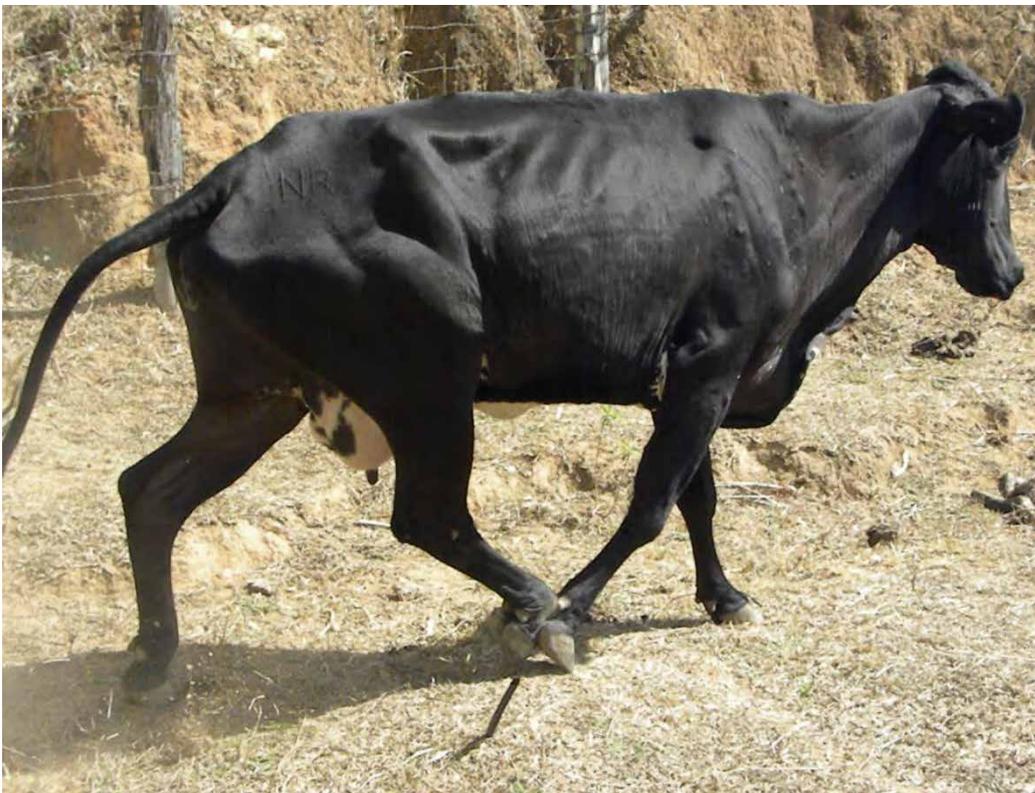


Figura 10- Neurotoxicose por *A. clavatus*. *Propriedade D*, Bovino 2. Hipermetria dos membros pélvicos. Observa-se que os membros torácico e pélvico direitos se tocam.



Figura 11- Neurotoxicose por *A. clavatus*. *Propriedade D*, Bovino 2. Dismetria e abdução exagerada dos membros torácicos. Região pélvica baixa, denotando fraqueza muscular nos membros pélvicos.

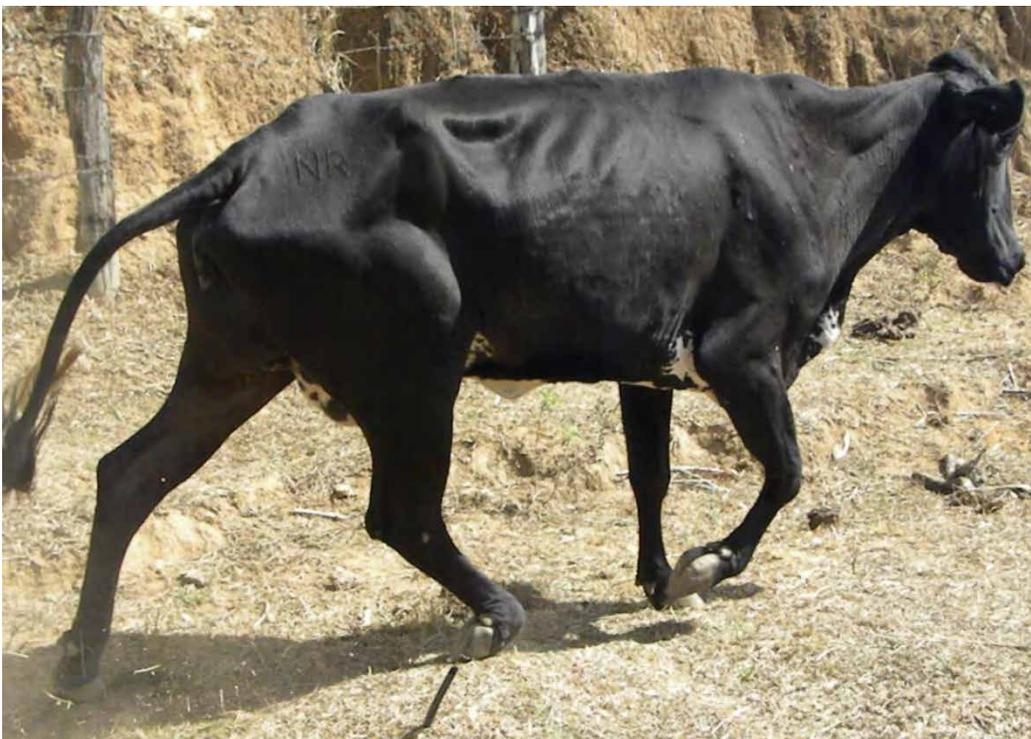


Figura 12- Neurotoxicose por *A. clavatus*. *Propriedade D*, Bovino 2. “Emboletamento” do membro pélvico direito.

O Bovino 3D apoiava-se sobre os boletos flexionados dos membros pélvicos constantemente e apresentava hipermetria com deslocamento do apoio para os membros torácicos (Figura 13). Após sete dias de evolução clínica, apresentou-se em decúbito esternal e quando estimulado ou por vontade própria, em função da dificuldade em elevar a região pélvica, não conseguia se levantar, intercalando períodos de decúbito esternal e lateral; normorexia, apreensão, mastigação e deglutição sem alterações. Ao exame neurológico, os reflexos cranianos, panicular, dos membros anteriores, de cauda e ânus apresentavam-se inalterados, exceto pelo tônus moderado da língua. As mucosas apresentavam-se moderadamente congestionadas, com vasos episclerais ingurgitados. O animal veio a óbito dois dias depois, totalizando nove dias de evolução clínica. Neste mesmo dia, outro animal foi encontrado morto no pasto, por ocasião da nossa visita, sem que o tratador tivesse dado falta.



Figura 13- Neurotoxicose por *A. clavatus*. Propriedade D, Bovino 3. Apoio sobre os boletos dos membros pélvicos e hipermetria com deslocamento do apoio para os membros torácicos.

Em relação ao Bovino 4D, foi observado inicialmente, discreta incoordenação, entretanto no dia seguinte, o quadro clínico havia evoluído para rigidez, tropeços e “emboletamento” dos membros pélvicos. No decorrer de seis dias de evolução clínica, apresentou-se em decúbito esternal, incapaz de levantar-se. No oitavo dia de evolução,

passou ao decúbito lateral com opistótono (Figura 14), tremores discretos, fezes em disco, mucosas moderadamente congestionadas e vasos episclerais ingurgitados e rúmen em atonia. Ao exame neurológico, foi constatada ausência de reflexo panicular e de sensibilidade no membro pélvico direito; sensibilidade diminuída no membro pélvico esquerdo e ausente nos membros torácicos. Reflexos cranianos, tração da língua, reflexo anal e da cauda sem alterações. O animal então foi eutanasiado e necropsiado.

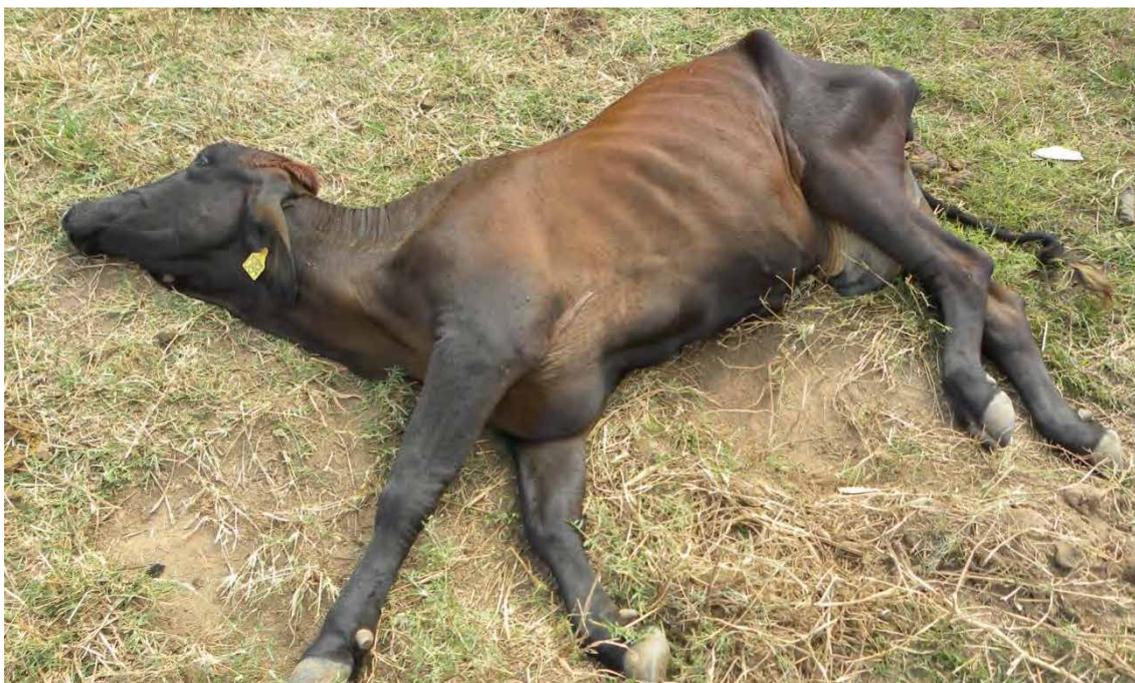


Figura 14- Neurotoxiose por *A. clavatus*. Propriedade D, Bovino 4. Decúbito lateral e opistótono.

O Bovino 5D encontrava-se em decúbito esternal e alerta, porém incapaz de levantar-se, além de apresentar tremores musculares e blefaroespasmos ocasionais, principalmente durante sua manipulação. Ao exame neurológico, os reflexos cranianos, tração da língua e a sensibilidade dos membros estavam inalterados. No dia seguinte foi encontrado morto, em decúbito esternal com a cabeça voltada para o flanco (posição de auto auscultação). À necropsia, observaram-se sinais de autólise incipiente.

O Bovino 6D encontrava-se em decúbito lateral com tremores musculares, hiperexcitabilidade e opistótono. Reflexos cranianos, tônus da língua e sensibilidade de membros apresentavam-se normais. Encontrado morto no dia seguinte com presença de urubus sobre o cadáver. Não foi realizada a necropsia.

O Bovino 7D encontrava-se alerta e em decúbito esternal com tremores nos músculos da face, focinho, membros e flanco. Quando estimulado, não esboçava tentativa de se levantar. O teste de sensibilidade nos membros e face normais, tônus da língua e reflexos craniais não apresentou alterações. Mais tarde, durante a observação, o animal tentou levantar-se, por iniciativa própria, sem sucesso. No dia seguinte encontrava-se em decúbito lateral, apresentando opistótono, estrabismo convergente, vasos episclerais ingurgitados, mucosas congestas e dilatação da pupila. Tremores musculares e reflexos, bem como o tônus da língua, mantiveram-se como no dia anterior. O animal foi então eutanasiado e necropsiado.

O Bovino 8D muito eventualmente, apresentava discreta incoordenação no início do quadro clínico. Após dois dias de evolução, entrou em decúbito esternal, demonstrando-se incapaz de se levantar. Foi encontrado morto, após sete dias de evolução clínica.

Até o término do primeiro carregamento de cevada, 14 animais morreram com evolução clínica média de 6 a 9 dias. Os primeiros óbitos foram de animais de maior produção leiteira que justamente recebiam maior quantidade de cevada na alimentação, porém, todos os animais tiveram acesso a ela, inclusive as vacas “secas”. A cronologia dos eventos e óbitos ocorridos na *Propriedade D* encontra-se na Tabela 2.

Apesar do elevado número de óbitos, a cevada não foi suspensa, pelo contrário, todos os animais ingeriram o subproduto em quantidade superior ao usual para suprir a escassez de capim, característica no período de estiagem. Todo o volumoso fornecido aos animais provinha de pastagens de outras propriedades e era oferecido picado em alternância com a cevada. Somente após dois dias da chegada do segundo carregamento, o uso do subproduto foi suspenso, quando dois animais pertencentes ao grupo dos assintomáticos até então, apresentaram os mesmos sinais clínicos do início do surto. Após a suspensão, outros quatro animais morreram.

Os dados epidemiológicos do surto 2 são descritos na Tabela 3.

Tabela 2- Ordem cronológica dos eventos e óbitos ocorridos na *Propriedade D*.

<b>Dia</b>	<b>Evento</b>
0	Chegada 1º carregamento de cevada
8	1º óbito
12	2º óbito
23	3º, 4º e 5º óbitos
25	6º, 7º e 8º óbitos
27	9º, 10º e 11º óbitos
30	12º(necropsia), 13º e 14º(necropsia) óbitos
32	Chegada 2º carregamento de cevada
34	Suspensão da cevada
36	15º óbito
37	16º(necropsia) óbito
39	17º e 18º óbitos

Tabela 3- Dados epidemiológicos do surto 2 no município de Paty do Alferes em 2011.

<b>Propriedade D</b>	
Início sinais clínicos após administração de cevada (dias)	8
Evolução clínica (dias)	6-9
Nº de doentes	19
Nº de óbitos	18
Nº de necropsias	3

O emprego de “cevada” na alimentação dos animais da *Propriedade E* (surto 3) já havia sido feito anos antes, sem nenhuma intercorrência e depois, suspenso. Em 2012, foi retomado; o primeiro carregamento de cevada chegou em agosto e durou 45 dias, sem que tenham sido registrados quaisquer problemas. Já o segundo carregamento de cevada, assim que chegou, percebeu-se a coloração mais escura, odor forte e a consistência mais líquida. Em poucos dias, formou-se uma camada superficial de bolor que para a alimentação dos animais, essa camada era retirada e a subjacente, oferecida. Ambos os carregamentos foram fornecidos por uma distribuidora localizada no

município de Valença. A cevada era armazenada em um tanque de alvenaria, parcialmente coberto (Figura 15).



Figura 15- Tanque de armazenamento da cevada da *Propriedade E*.

Havia um total de 21 vacas sendo ordenhadas, das quais 10 ingeriam “cevada molhada” (CM), que nada mais era que cevada misturada com água, capim e cana picados, além de “cevada seca” (CS), ou seja, sem adição extra de água e qualquer outro alimento; enquanto as outras 11 recebiam apenas CS. As vacas que adoeceram pertenciam ao grupo das que comiam CM e CS, (justamente as de maior produção leiteira, entre 15 e 25 litros/dia).

Decorridos 13 dias da chegada do 2º carregamento, os primeiros sintomas foram observados em cinco vacas que, em estação, apresentaram tremores musculares acentuados nos membros pélvicos e taquipneia. Após a ordenha da tarde, ao caminharem em direção ao pasto, as alterações tornaram-se mais evidentes, com andar em pequenos saltos, “sapateando”. No dia seguinte, uma dessas vacas amanheceu morta (Bovino 1E). O fornecimento de cevada foi suspenso nesse mesmo dia, entretanto, os animais ainda tiveram acesso ao restante que havia no cocho.

O segundo óbito (Bovino 2E) ocorreu na tarde do dia seguinte. Esse animal, ao descer do pasto “sapateando”, caiu e permaneceu taquipneica, em decúbito por cerca de oito horas. No momento do óbito, evidenciou-se sinal característico de edema pulmonar (eliminação de conteúdo espumoso pelas narinas). Ainda no mesmo dia, outras duas vacas (Bovinos 6E e 7E) apresentaram-se sintomáticas, além de um bezerro (Bovino 8E) de nove meses que ao caminhar, apresentou hiperestesia dos membros pélvicos.

O tratamento, à base de soroterapia, bicarbonato de sódio e dexametasona/EV, iniciou-se cerca de 48 horas após o início do aparecimento dos sintomas na propriedade. Apenas um animal (Bovino 6E) recuperou-se dos sinais clínicos após dois dias de tratamento, contudo não restabeleceu seu escore corporal, tampouco, sua produção leiteira até a data da nossa última visita.

Outros três óbitos (Bovinos 3E, 4E e 7E) ocorreram nas 24 horas seguintes e o último (Bovino 5E), após 48 horas.

Os animais voltaram a receber apenas cevada seca oito dias após o início do surto na propriedade. No mesmo dia, outro animal (Bovino 9E) adoeceu e antes da suspensão definitiva do fornecimento de cevada, ocorrida somente 13 dias depois, o bezerro (Bovino 8E) amanheceu morto após 16 dias de evolução clínica. A cronologia dos óbitos e os dados da evolução clínica dos animais são apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Deste surto, apenas o bezerro (Bovino 8E) foi necropsiado e o Bovino 4E teve seu encéfalo submetido ao exame histopatológico. O Bovino 9E, após permanecer em decúbito esternal por longos períodos, recuperou-se parcialmente e 22 dias após o início dos sinais clínicos, ainda apresentava sequelas no movimento do membro pélvico direito ao locomover-se para mudar de direção (Figura 16 a, b, c, d). Os dados epidemiológicos do surto 3 são descritos na Tabela 6.

Tabela 4- Cronologia dos óbitos a partir da chegada do carregamento de cevada e do início dos sinais clínicos na *Propriedade E*.

<b>Dia</b>	<b>Bovino</b>	<b>Evento</b>	<b>Necropsia</b>
0	N.A.	Chegada do carregamento de cevada	N.A.
13	1, 2, 3, 4, e 5	Início dos sinais clínicos	N.A.
14	1	Óbito/Suspensão do fornecimento de cevada	N
15	2 / 6, 7 e 8	Óbito / Início dos sinais clínicos	N
17	3, 4* e 7	Óbito	N*
19	5	Óbito	N
21	9	Reinício da administração de cevada/ Início dos sinais clínicos	N.A.
31	8	Óbito	S
34	N.A.	Suspensão definitiva do fornecimento de cevada	N.A.

N.A.- Não se aplica, S- Sim, N- Não, \*Histopatologia do cérebro.

Tabela 5- Evolução clínica e desfecho dos animais da *Propriedade E*, envolvidos no surto 3.

<b>Bovino</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Evolução clínica</b>	<b>Desfecho</b>
1	F	6 anos	1 dia	Óbito sem necropsia
2	F	8 anos	2 dias	Óbito sem necropsia
3	F	5 anos	4 dias	Óbito sem necropsia
4	F	8 anos	4 dias	Óbito sem necropsia
5	F	4 anos	6 dias	Óbito com coleta do encéfalo
6	F	6 anos	2 dias	Recuperada após soroterapia
7	F	6 anos	2 dias	Óbito sem necropsia
8	M	8 meses	16 dias	Óbito com necropsia
9	F	4 anos	22 dias <sup>1</sup>	Recuperada com discreta sequela <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Avaliação realizada com 22 dias de evolução.

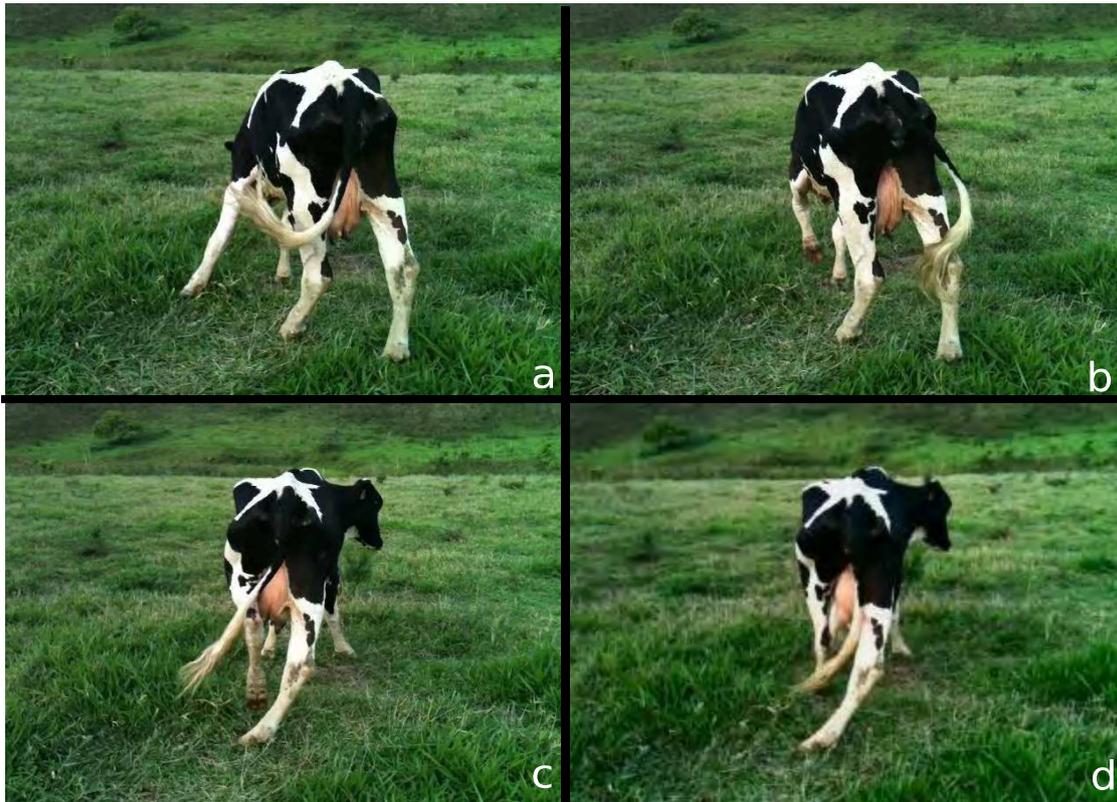


Figura 16 a, b, c, d- Neurotoxicose por *A. clavatus*. Propriedade E, Bovino 9. Sequência de movimentos realizados na locomoção diante da mudança de direção. c,d. Animal arrasta a pinça do membro pélvico direito antes da flexão do jarrete.

Tabela 6- Dados epidemiológicos do surto 3 no município de Valença em 2012.

<b>Propriedade E</b>	
Início sinais clínicos (dias) após fornecimento de cevada	13
Evolução clínica(dias)	1-16
Nº de doentes	9
Nº de óbitos	7
Nº de necropsias	1

Na *Propriedade F* (surto 4), a cevada era estocada em um tanque de alvenaria e estava sendo utilizada na alimentação dos animais há cinco meses, sem nenhum problema até então (Figura 17). Cinco dias após a chegada do último carregamento, o tratador observou um bolor escuro azul a esverdeado que rapidamente recobriu toda a superfície da cevada no tanque de armazenamento (Figura 18 a, b). Mesmo assim, continuou fornecendo-a aos animais sem que fosse retirada a camada superficial embolorada.

A cevada era fornecida diariamente, juntamente com pão na proporção de 20 kg e 2 kg, respectivamente, divididos em dois tratos (manhã e tarde). O carregamento, em média, de 14 toneladas era consumido num período de 45 dias nos primeiros meses, porém com a aquisição de outros animais, o consumo total foi reduzido para 30 dias. A cevada distribuída pelo mesmo fornecedor da *Propriedade D*.



Figura 17- Tanque de armazenamento da cevada na *Propriedade F*.

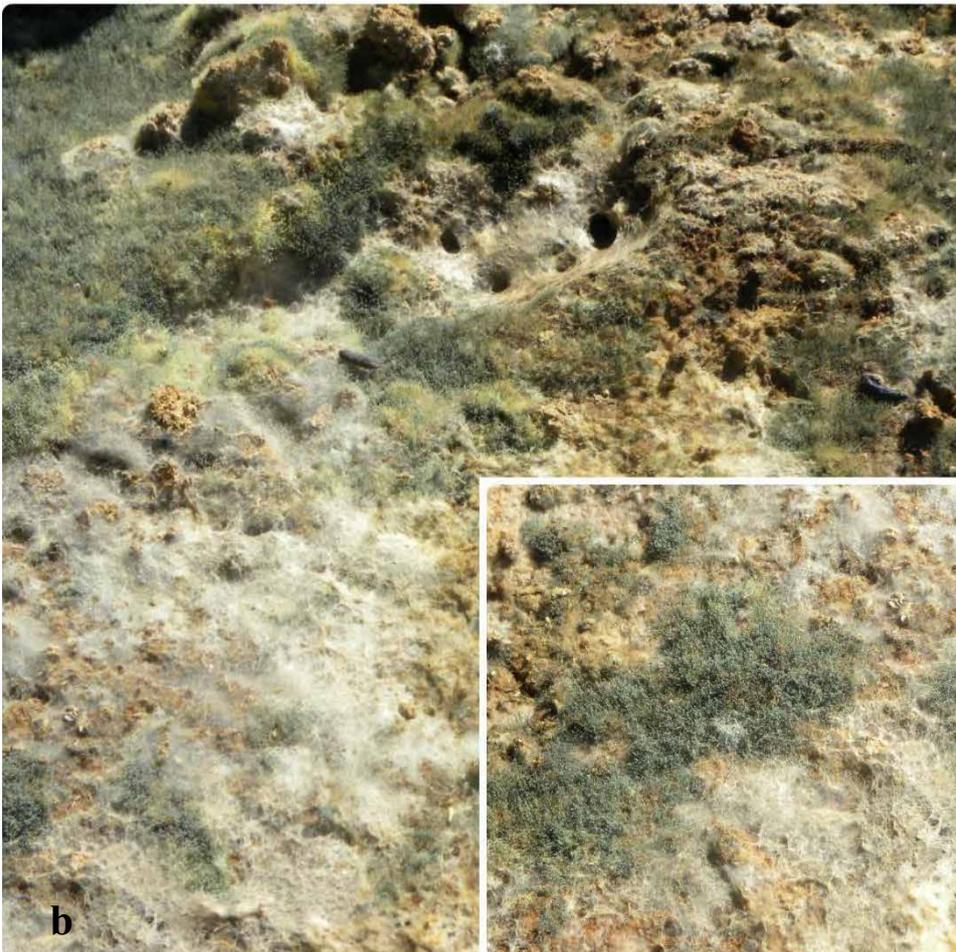


Figura 18- Aspecto da superfície da cevada apresentando bolor escuro, azul esverdeado na *Propriedade F*. a- cevada recolhida do pasto após a retirada da camada superficial do tanque; b- cevada encontrada no tanque.

Oito dias após a chegada do último carregamento, o primeiro animal, uma vaca de 36 meses adoeceu (Bovino 1F). Pela manhã, inicialmente, apresentou-se “assustadiça” e inquieta e à tarde, pulava elevando excessivamente os jarretes (“sapateando”) e com muita dificuldade para subir do piquete para a entrada do curral. Foi medicada com Mercepton® E.V. e no dia seguinte amanheceu em decúbito esternal, erguendo somente os membros anteriores na tentativa de levantar-se. Ainda pela manhã do 9º dia, alimentou-se e ingeriu água mesmo deitada. Nesse mesmo dia, outros quatro animais adoeceram (Bovinos 2F, 3F, 4F e 5F). O Bovino 2F “sapateava” ainda mais que o primeiro, apresentava hiperexcitabilidade, tremores mais acentuados, principalmente, na cabeça e, sialorreia. À noite entrou em decúbito lateral e veio a óbito na tarde do 10º dia, quando outro animal (Bovino 6F) apresentou os primeiros sintomas. O Bovino 1F foi encontrado morto no 11º dia. No mesmo dia, mais cinco animais apresentaram sinais semelhantes (Bovinos 7F, 8F, 9F, 10F e 11F).

Os Bovinos 3F, 4F e 5F estavam no piquete quando os sinais clínicos foram observados (9º dia). O Bovino 3F foi encontrado caído e com muita dificuldade, foi tangido até o curral. Durante o percurso, apresentou quedas e rigidez dos membros pélvicos. O Bovino 4F, locomoveu-se sozinho para o curral, apresentava tremores e hiperexcitabilidade. No dia seguinte (10º dia), ambos apresentaram-se em decúbito esternal, porém com normorexia e normodipsia. Três dias após (13º dia), já estavam em decúbito lateral no curral, com opistótono, tremores, hiperestesia, estrabismo ventromedial e dispneia, já em fase agônica e vieram a óbito durante a nossa visita, quando foram imediatamente necropsiados.

O Bovino 5F, um tourinho de um ano e quatro meses, que inicialmente apresentou um quadro clínico mais brando, foi mantido no piquete juntamente com outras duas vacas (Bovinos 6F e 7F), mas no momento da visita (13º dia), os três animais já estavam em decúbito lateral com tremores e dispneia. Os Bovinos 6F e 7F vieram a óbito no final da tarde desse mesmo dia e o Bovino 5F na manhã do dia seguinte (14º dia).

Os Bovinos 8F, 9F, 10F e 11F foram trazidos para um piquete mais próximo e estavam no curral no momento da nossa visita (13º dia). Inicialmente apresentavam também sinais clínicos semelhantes às anteriores, porém mais brandos, com exceção dos Bovinos 8F e 9F que além de não conseguirem subir um pequeno aclive na entrada do curral, apresentavam tremores mais acentuados e quedas em pequenos percursos.

Após 2 dias de evolução clínica, foram tratados com 200 mg de dexametasona e soroterapia (3,5 L de Ringer e soro glicosado) E.V. O Bovino 8F apresentou significativa melhora dos sinais clínicos quando comparado ao Bovino 9F, que melhorou discretamente da incoordenação motora. Após oito dias de evolução clínica, o Bovino 9F começou a andar apoiando-se sobre os boletos flexionados dos membros pélvicos e apresentou urina de coloração castanho escura avermelhada (Figura 19 a, b). Ainda nesse mesmo dia (19º dia), outros dois animais (Bovinos 12F e 13F), até então assintomáticos, apresentaram tremores discretos na região do flanco; o Bovino 12F ao caminhar apoiava-se sobre o boleto flexionado do membro pélvico esquerdo e o Bovino 13F, com os membros pélvicos exageradamente abduzidos.

No dia seguinte (20º dia), após algumas tentativas de manter-se em pé, o Bovino 9F permaneceu em decúbito esternal no pasto, durante todo o dia e não se levantou mais. No mesmo dia, após uma piora da sintomatologia clínica, o Bovino 10F caiu e ficou com os membros pélvicos presos entre o corrimão e a parede da sala de ordenha (Figura 20 a), com acentuado tremor na cabeça, fraqueza muscular, incoordenação dos membros pélvicos e relutância em se movimentar. Após inúmeras tentativas de levantá-lo, locomoveu-se sozinho por alguns metros até cair novamente no curral com os membros pélvicos posicionados caudalmente (Figura 20 b). Na manhã seguinte (21º dia), o Bovino 9F foi encontrado morto após 10 dias de evolução clínica e em seguida, necropsiado. O Bovino 10F que já se encontrava em decúbito lateral, veio a óbito três dias depois (24º dia) com 13 dias de evolução clínica.

Os dados epidemiológicos sobre o surto 4, bem como, a evolução clínica e o desfecho dos animais envolvidos estão representados nas Tabela 7 e 8, respectivamente.

O fornecimento de cevada e do pão na alimentação dos animais foi suspenso por completo 10 dias após a entrega do último carregamento, dois dias após o aparecimento do primeiro animal sintomático. A queda da produção leiteira dos animais sobreviventes foi estimada em aproximadamente 90%.

Após 35 dias do início do surto na *Propriedade F*, dos quatro animais sobreviventes (Bovinos 8F, 11F, 12F e 13F), três ainda mostravam alterações neurológicas e locomotoras. O Bovino 8F apresentou tremores após movimentação forçada e ao caminhar, o membro pélvico direito tocava o pélvico esquerdo na sua face medial, na altura da articulação metatarsofalangeana, provocando uma lesão cutânea traumática no local. O Bovino 11F, ao locomover-se, arrastava o membro pélvico esquerdo, diminuindo a amplitude do movimento. O Bovino 12F elevava,

demasiadamente, o jarrete do membro pélvico direito e apresentava dificuldade na locomoção dos membros pélvicos ao girar o corpo para mudar de direção. Durante a movimentação forçada, apresentou quedas e tremores discretos na região do flanco e membros.

Os dados comparativos de morbidade, mortalidade e letalidade entre os surtos são descritos na Tabela 9.

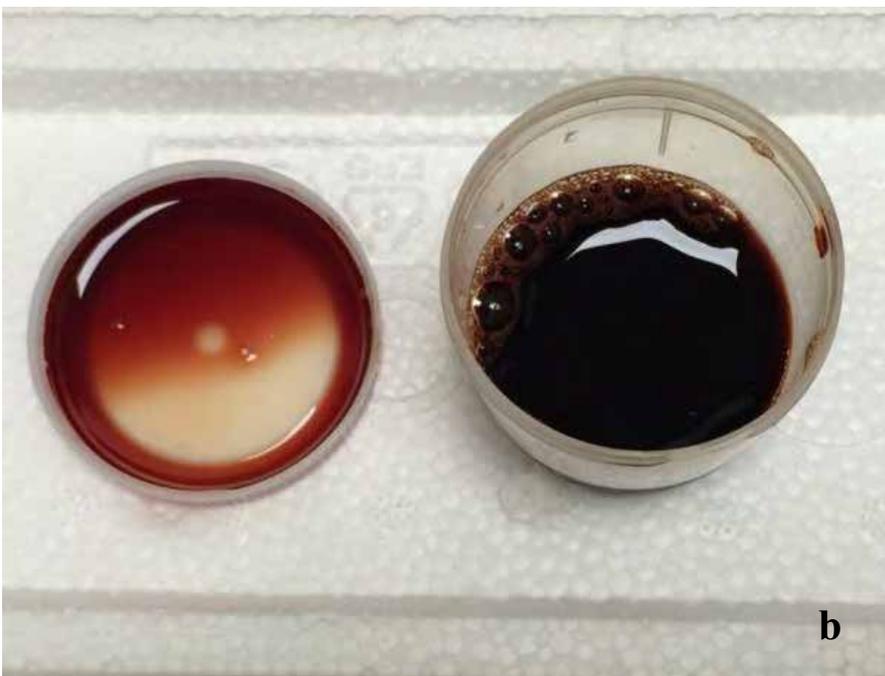


Figura 19 a b- Neurotoxicose por *A. clavatus*. Propriedade F. Bovino 9. a- Coleta de urina por micção espontânea; b-Urina de coloração castanho-avermelhada.



Figura 20 a, b- Neurotoxicose por *A. clavatus*. Propriedade F. Bovino 10. a- Queda na sala de ordenha e depois de inúmeras tentativas de levantar o animal, nova queda (b) no curral com posicionamento caudal dos membros pélvicos.

Tabela 7- Dados epidemiológicos do surto 4 no município de Barra Mansa em 2016.

<b>Propriedade F</b>	
Início sinais clínicos após fornecimento de cevada (dias)	8
Evolução clínica (dias)	1-13
Nº de doentes	13
Nº de óbitos	9
Nº de necropsias	3

Tabela 8- Dados de evolução clínica e desfecho dos animais da *Propriedade F*, envolvidos no surto 4.

<b>Bovino</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Evolução clínica</b>	<b>Desfecho</b>
1	F	3 anos	3 dias	Óbito sem necropsia
2	F	3 anos	1 dia	Óbito sem necropsia
3	F	3 anos	4 dias	Óbito com necropsia
4	F	3 anos	4 dias	Óbito com necropsia
5	M	1,4 anos	5 dias	Óbito sem necropsia
6	F	3 anos	3 dias	Óbito sem necropsia
7	F	3 anos	2 dias	Óbito sem necropsia
8	F	3 anos	viva	Em recuperação <sup>1</sup>
9	F	3 anos	10 dias	Óbito com necropsia
10	F	3 anos	13 dias	Óbito sem necropsia
11	F	3 anos	viva	Em recuperação <sup>1</sup>
12	F	3 anos	viva	Em recuperação <sup>1</sup>
13	F	3 anos	viva	Em recuperação <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Avaliação realizada com 35 dias após o início do surto 4.

Tabela 9- Dados epidemiológicos comparativos entre os surtos estudados- percentuais de morbidade, mortalidade e letalidade.

<b>Propriedades</b>	<b>SURTO 1 VALENÇA 2010</b>				<b>SURTO 2 PATY DO ALFERES 2011</b>	<b>SURTO 3 VALENÇA 2012</b>	<b>SURTO 4 BARRA MANSA 2016</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>Média</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
% Morbidade	18,75	40,00	62,50	41,42	73,08	42,86	72,22
% Mortalidade	6,25	40,00	12,50	58,75	69,23	33,33	50,00
% Letalidade	33,33	100,00	20,00	51,11	94,73	77,78	69,23

Verifica-se na Tabela 9 que os maiores percentuais de morbidade, mortalidade e letalidade foram observados animais do surto 2, quando comparado aos demais surtos. Contudo, ao analisarmos isoladamente a *Propriedade B*, envolvida no surto 1, esta registrou 100% de letalidade.

## 4.2 Macroscopia

As lesões macroscópicas, quando presentes, foram observadas na musculatura dos membros pélvicos (semitendíneo, semimembranáceo, adutor, e pectíneo), da cintura pélvica (psoas), *Longissimus dorsi* e no miocárdio (músculo papilar e parede do ventrículo esquerdo).

Na *Propriedade B*, das duas necropsias realizadas, apenas no Bovino 5, evidenciaram-se áreas pálidas no músculo semitendíneo (Figura 21).

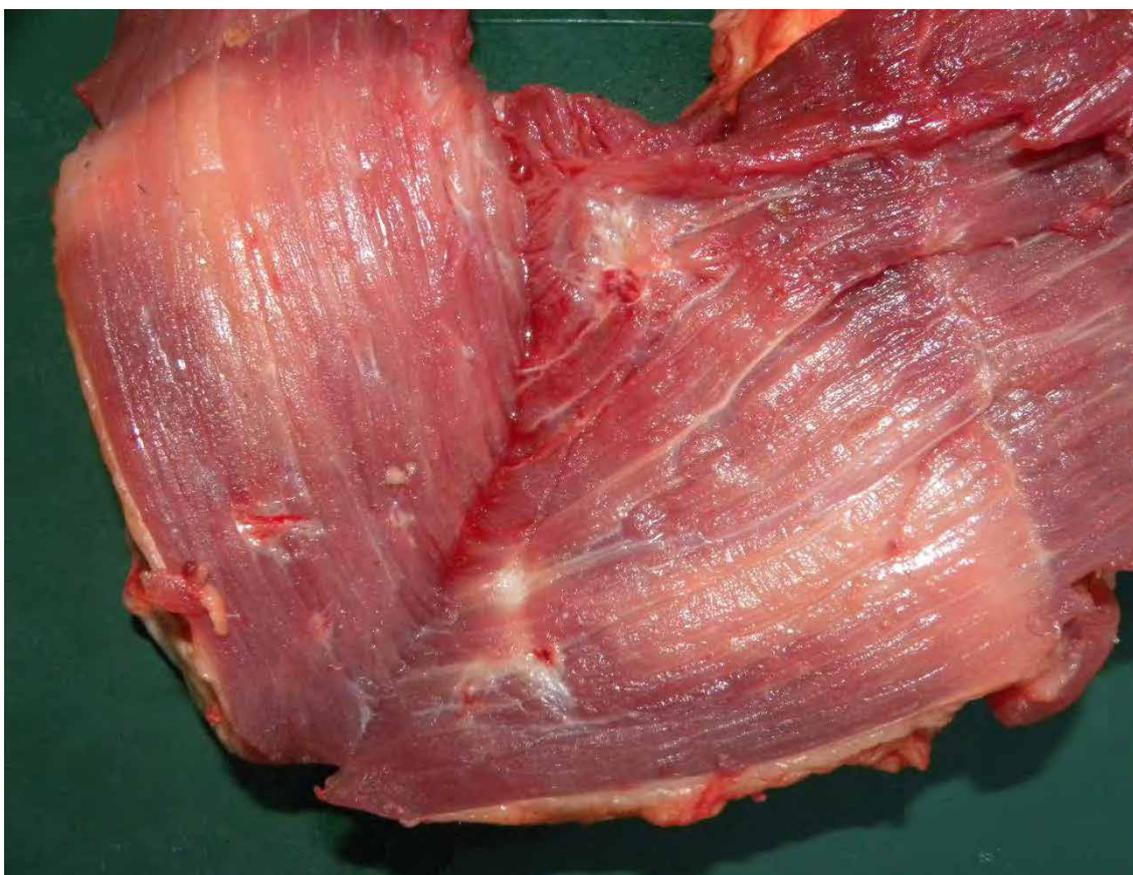


Figura 21- Lesões musculares observadas na neurotoxicose por *A. clavatus*. Surto 1, *Propriedade B*, Bovino 5. Áreas pálidas focais no músculo semitendíneo.

Por sua vez, na *Propriedade D*, dos três animais necropsiados, somente o Bovino 1 apresentou uma área circunferencial esbranquiçada e bem delimitada no músculo *Longissimus dorsi*.

Já na *Propriedade E*, no único animal necropsiado, um bezerro de nove meses de idade, foram observadas áreas pálidas em alternância com áreas de coloração normal nos músculos semimembrâneo e adutor, acompanhadas de hemorragia (Figura 22).

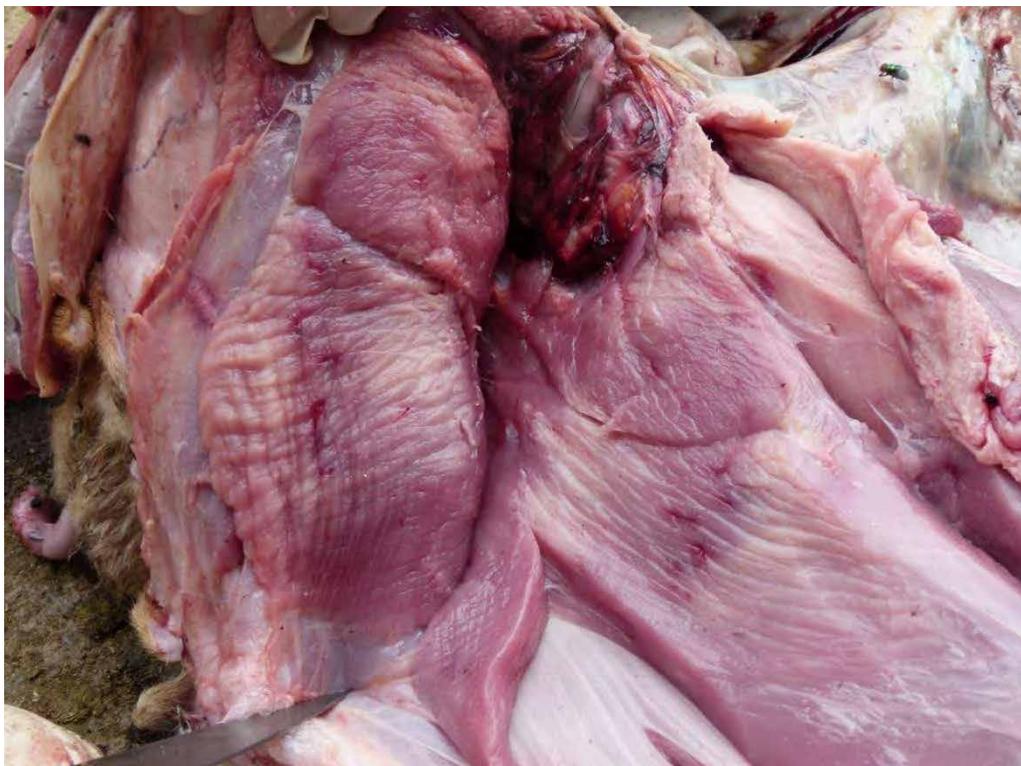


Figura 22- Lesões musculares observadas na neurotoxicose por *A. clavatus*. *Propriedade E*. Bovino 1. Áreas pálidas em alternância com áreas de coloração normal nos músculos semimembrâneo e adutor, com presença de hemorragia.

Por fim, na *Propriedade F*, dos três animais necropsiados, o Bovino 3 apresentou áreas pálidas na musculatura esquelética dos membros pélvicos e no miocárdio, na parede do ventrículo esquerdo e músculo papilar. Foi observada ainda coloração rubra, de aspecto vítreo, no músculo psoas. (Figuras 23 a 27). O Bovino 9, por sua vez, apresentou a bexiga repleta de urina de coloração castanho-avermelhada.



Figura 23- Lesões musculares observadas na neurotoxicose por *A. clavatus*.  
*Propriedade F. Bovino 3, músculo semimembranáceo.*



Figura 24- Lesões musculares observadas na neurotoxicose por *A. clavatus*.  
*Propriedade F. Bovino 3, músculo pectíneo.*



Figura 25- Lesões musculares observadas na neurotoxicose por *A. clavatus*. Propriedade F. Bovino 4, músculo papilar. Áreas pálidas particularmente próximas ao endocárdio.



Figura 26- Lesões musculares observadas na neurotoxicose por *A. clavatus*. Propriedade F. Bovino 3. Extensa área focal pálida no miocárdio, parede do ventrículo esquerdo.



Figura 27- Lesões musculares observadas na neurotoxicose por *A. clavatus*. Propriedade F. Bovino 3. Músculo psoas com coloração rubra, de aspecto vítreo.

### 4.3 Microscopia

Os cortes histológicos evidenciaram, sobretudo nos núcleos da medula oblonga e da base do cérebro, bem como nos do tálamo e dos cornos ventrais da medula espinhal, numerosos neurônios com alterações degenerativo-necróticas. Em geral, estas se apresentavam sob diversas formas de cromatólise; alguns neurônios cromatolíticos demonstravam núcleo picnótico central ou periférico, outros já em cariólise, com ou sem presença concomitante de vacúolos de variados tamanhos no citoplasma. Observavam-se também diversos neurônios marcadamente tumefeitos, com citoplasma homogêneo ou finamente vacuolizado ou ainda espumoso, que, por vezes tornavam-se fracamente corados (como “células-fantasma” ou “células-sombra”) ou em lise franca. Eventualmente percebem-se apenas os espaços vazios antes ocupados por esses neurônios que se desintegraram. Nas imediações, esferoides axonais foram ocasionalmente vistos. As lesões incidiram com intensidade e aspecto variáveis, coexistindo no mesmo núcleo ou grupo de neurônios; em alguns locais até 80-90% dos neurônios apresentavam algum tipo das lesões acima descritas. Neurônios vermelhos foram raramente encontrados. Em alguns locais havia moderada até acentuada infiltração inflamatória predominantemente mononuclear – numerosos linfócitos, alguns macrófagos e plasmócitos e raros neutrófilos -, bem como gliose focal ou localmente extensiva. No córtex cerebral foram observados ocasionais neurônios cromatolíticos ou degenerados e proliferação de astrócitos perineuronal, além de manguitos mononucleares no entorno dos vasos. Na base do cerebelo e mesencéfalo há marcada

infiltração inflamatória perivascular com focos de meningite e alguns esferoides axonais. Os cortes histológicos com as respectivas lesões no SNC e na musculatura estriada dos animais estão representados nas Figuras 28 a 49. Em um dos animais (Bovino 9, *Propriedade F*), ao corte histológico do rim, evidenciou-se nefrose mioglobinúrica com marcado aumento da filtração glomerular e dilatação dos túbulos por excesso de filtrado (Figuras 50 e 51) e, necrose coagulativa do miocárdio (Figuras 52 e 53). Demais órgãos, sem alterações significativas.

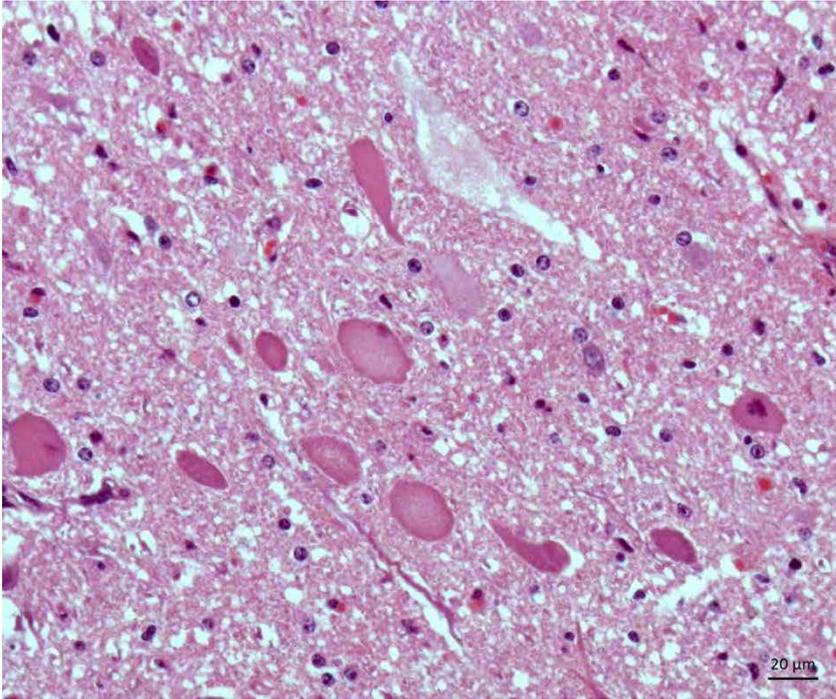


Figura 28- *Propriedade F*, Bovino 3. Mesencéfalo. Cromatólise-necrose com e sem picnose; neurônio em lise. HE Obj.40.

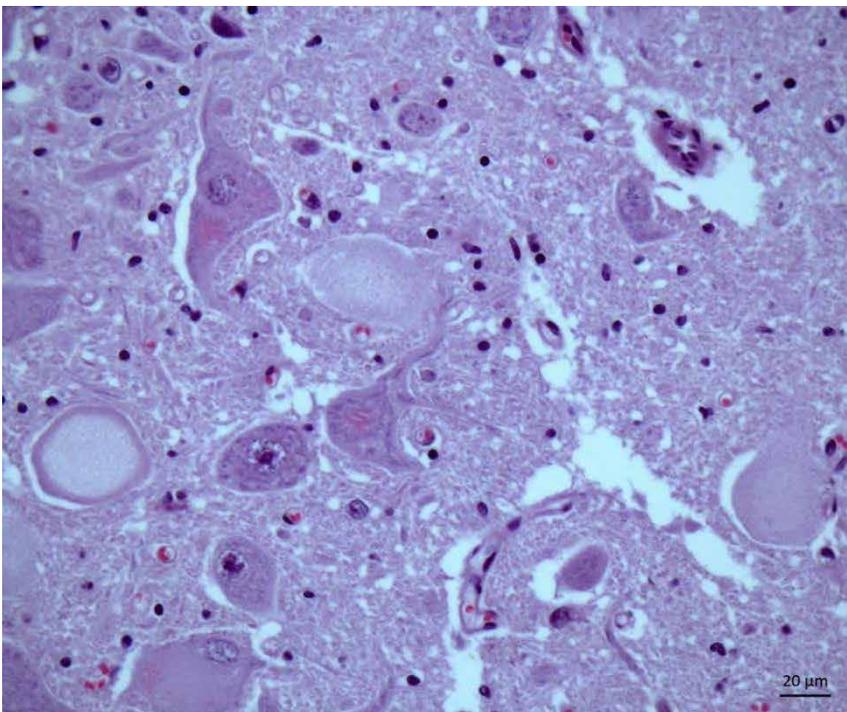


Figura 29- *Propriedade F*, Bovino 9. Tumefação de neurônios com cariólise (núcleo da base) HE Obj.40.

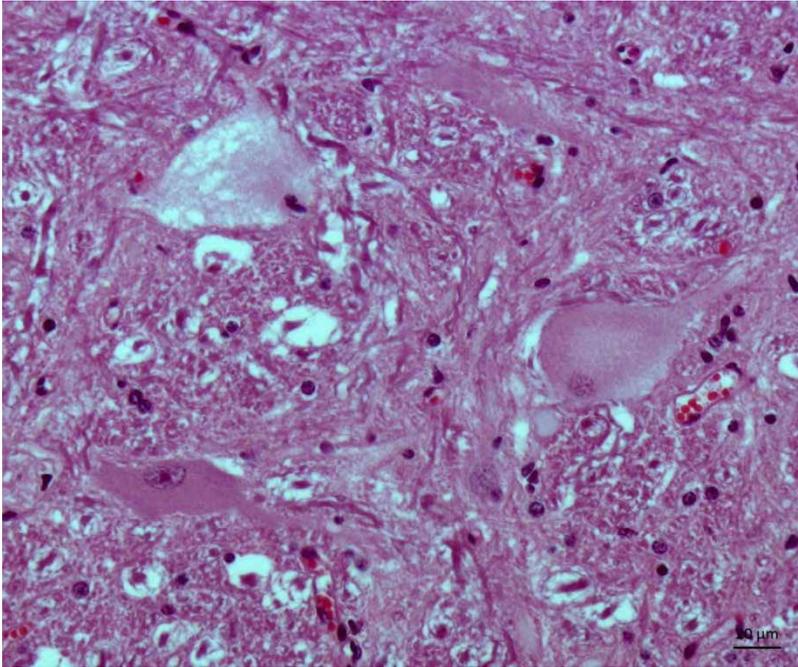


Figura 30- *Propriedade F*, Bovino 4. Cromatólise com deslocamento dos núcleos para a periferia com e sem picnose, cariólise e/ou lise. Núcleo ambíguo. HE Obj.40.

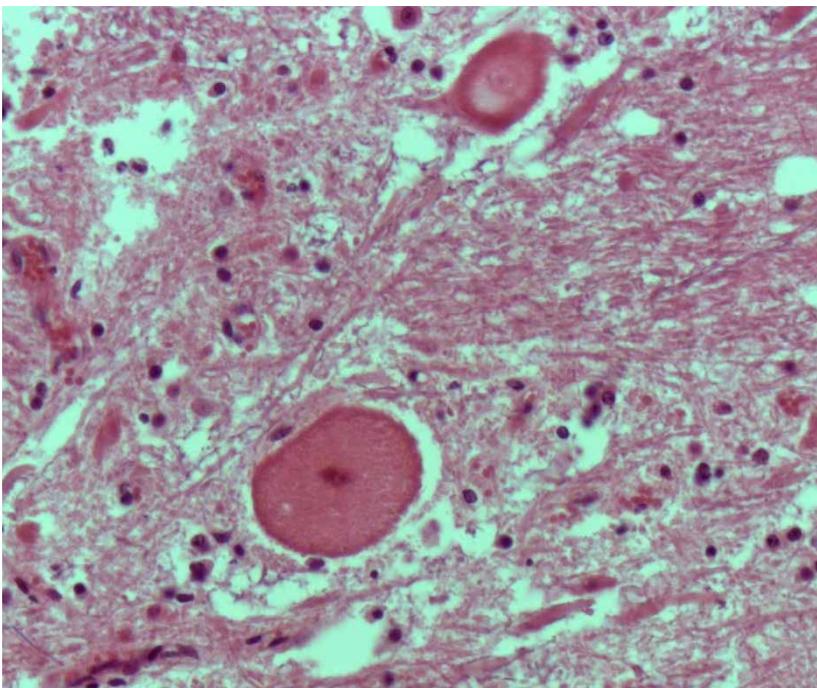


Figura 31- *Propriedade E*, Bovino 8. Neurônios cromatolíticos em núcleo da base do cerebelo. Na porção inferior da figura, neurônio cromatolítico com picnose; na superior, neurônio cromatolítico tumefeito com cariólise (sombra do núcleo). HE. Obj. 40.

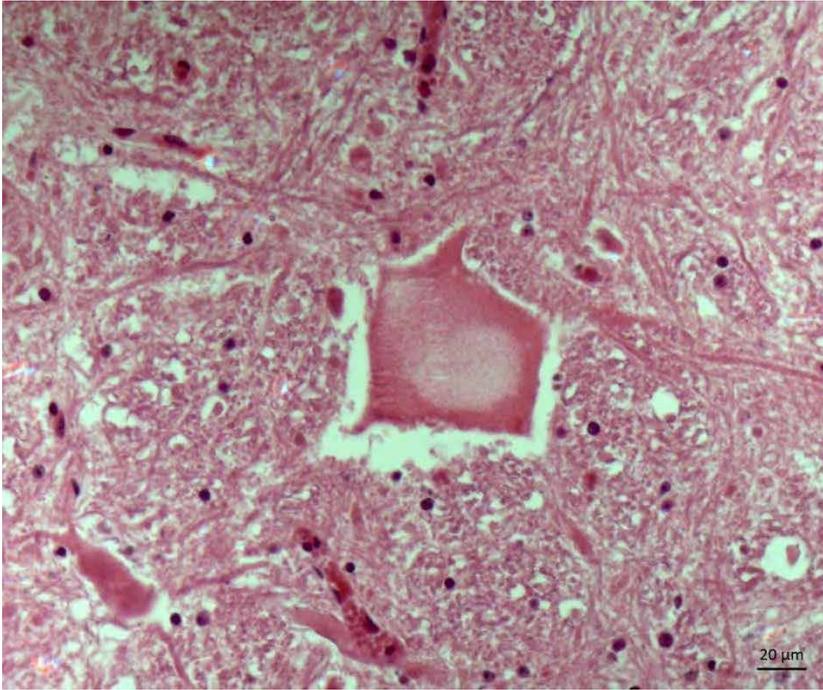


Figura 32- *Propriedade E*, Bovino 8 Neurônio cromatolítico (tigrólise acentuada), tumefeito, de aspecto espumoso em núcleo da base do cerebelo (detalhe da figura anterior). HE. Obj 40.

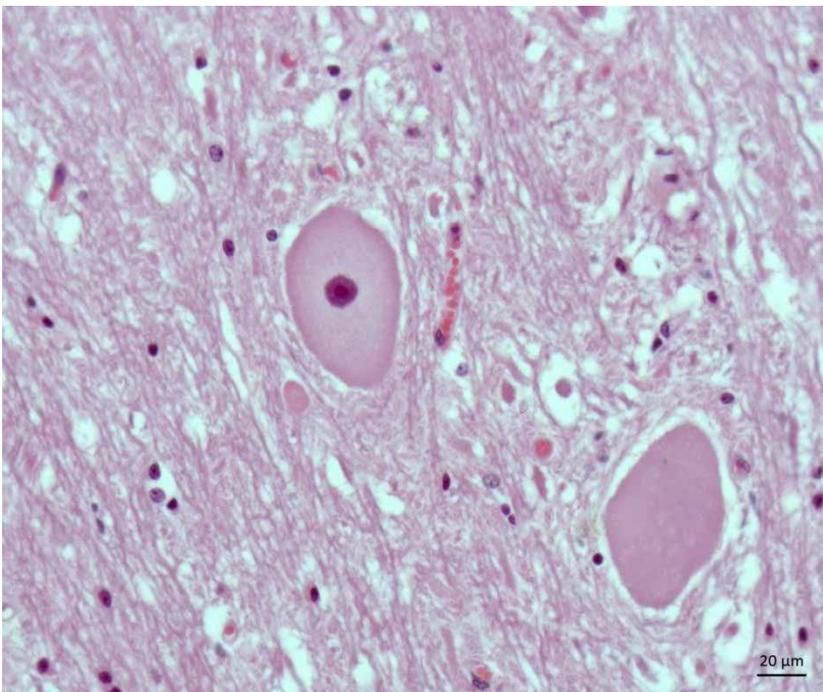


Figura 33- *Propriedade F*, Bovino 3. Núcleo da base do cerebelo Cromatólise-necrose com e sem picnose HE Obj.40.

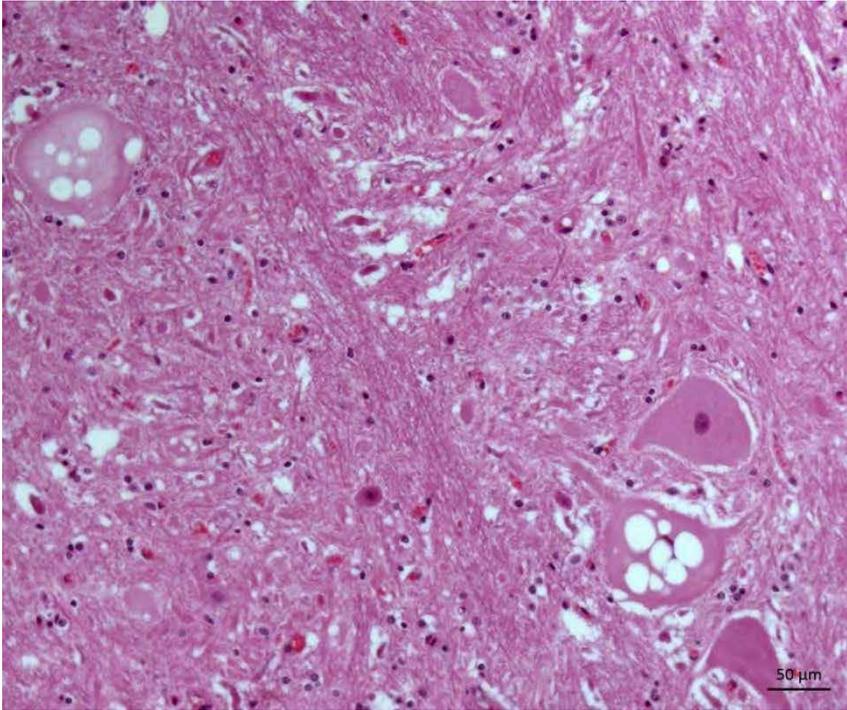


Figura 34- *Propriedade F*, Bovino 3. Núcleo da base do cerebelo. Cromatólise-vacuolização-tumefação HE Obj.10.

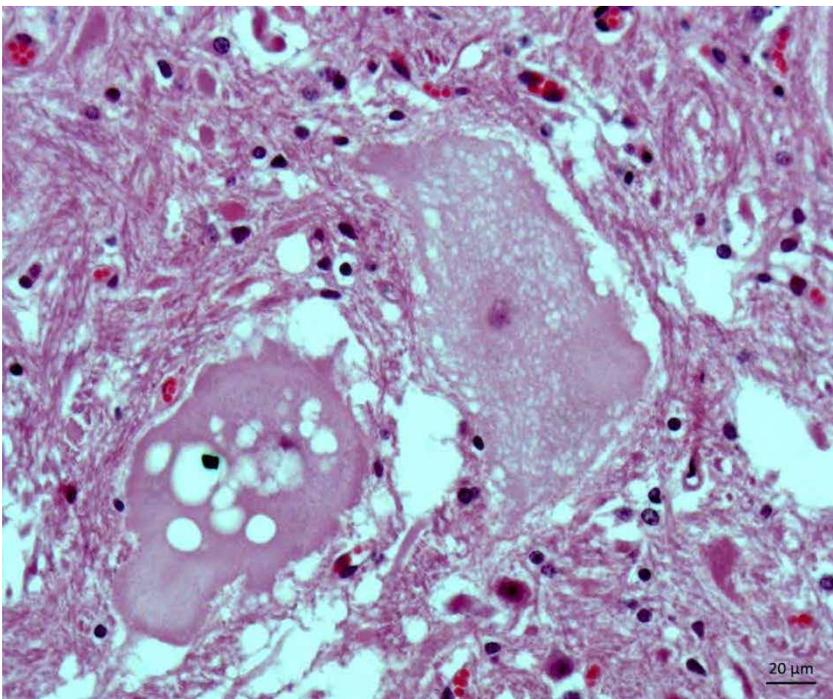


Figura 35- *Propriedade F*, Bovino 3. Núcleo da base do cerebelo. Cromatólise-vacuolização-tumefação HE Obj.40.

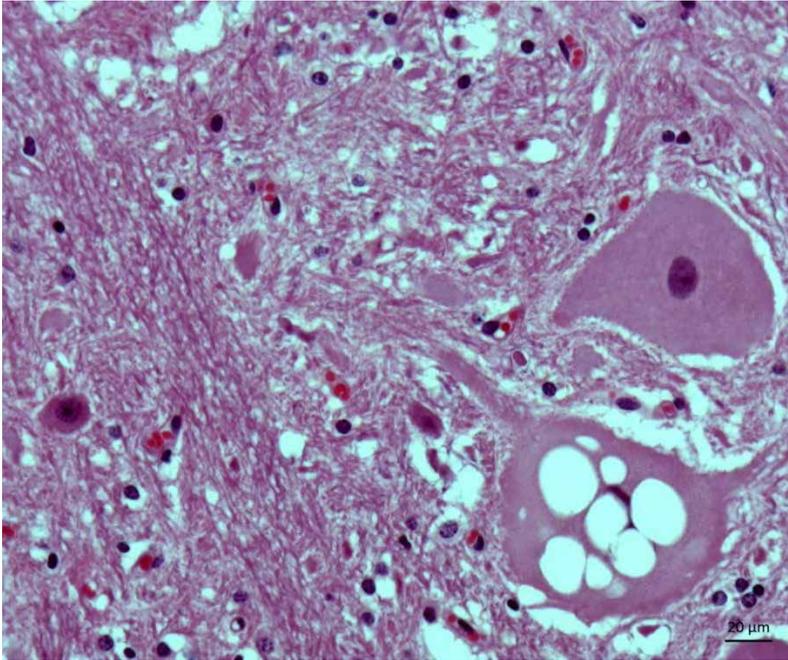


Figura 36- *Propriedade F*, Bovino 3. Núcleo da base do cerebelo. Neurônio cromatolítico e neurônio cromatolítico vacuolizado. HE Obj.40.

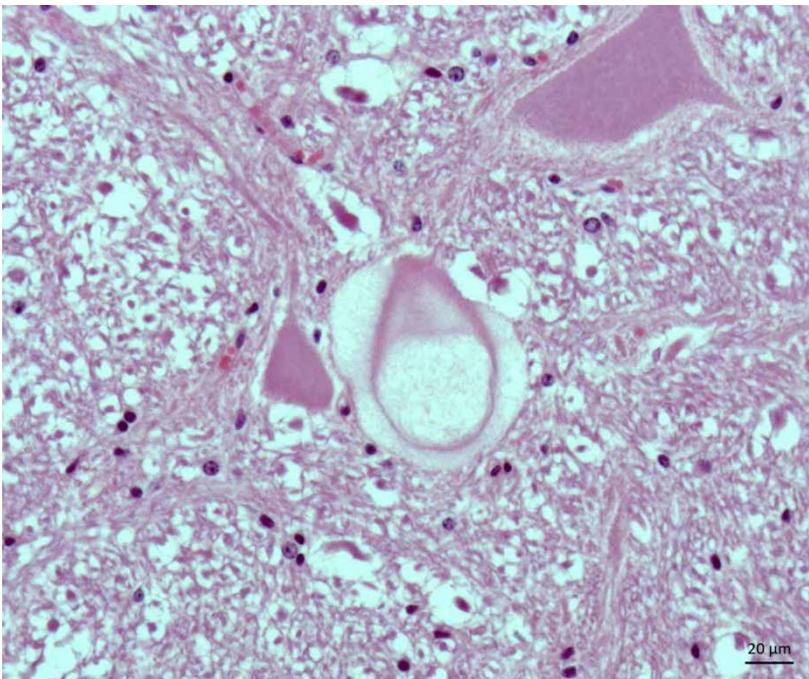


Figura 37- *Propriedade F*, Bovino 3. Núcleo da base do cerebelo. Neurônio cromatolítico, extremamente tumefeito, de aspecto espumoso, com extravasamento do conteúdo citoplasmático para o espaço perineuronal; dois outros neurônios cromatolíticos. HE Obj.40.

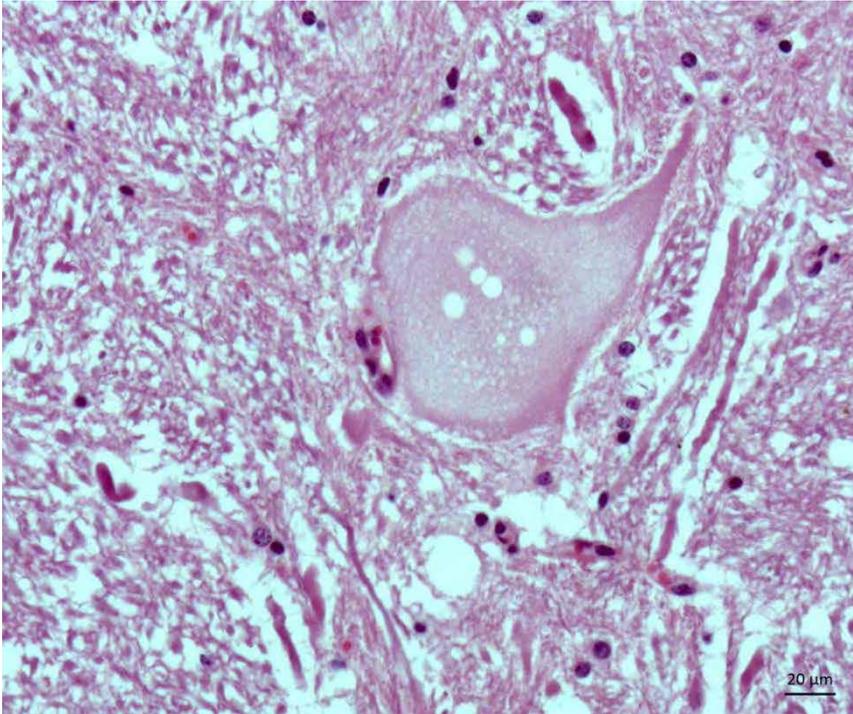


Figura 38- *Propriedade F*, Bovino 3. Neurônio cromatolítico, tumefeito, de aspecto espumoso com pequenos vacúolos. Núcleo da base do cerebelo. HE Obj.40.

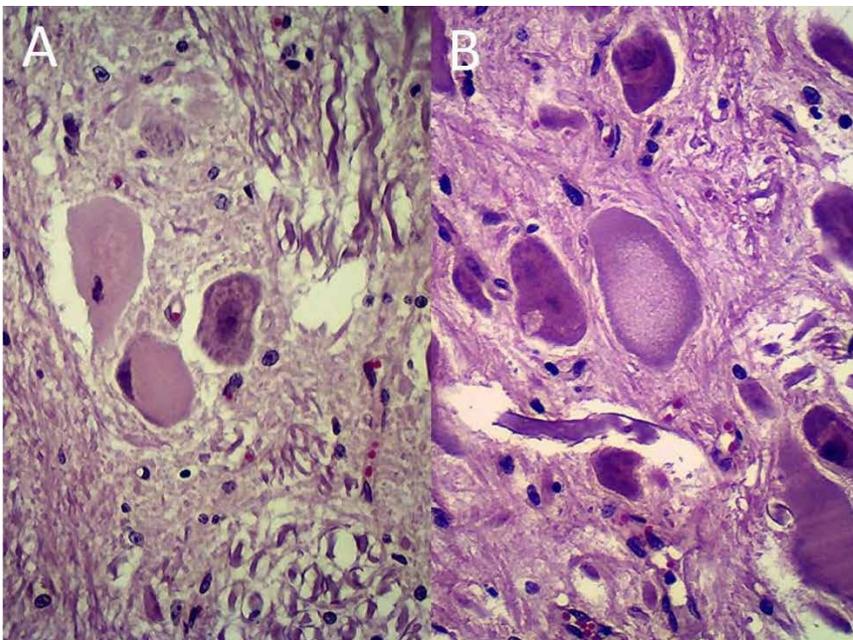


Figura 39- *Propriedade B*, Bovino 5. a-Necrose cromatolítica em neurônios dos cornos ventrais da medula espinhal. HE. Obj 10. b- Outro campo. HE. Obj 20.

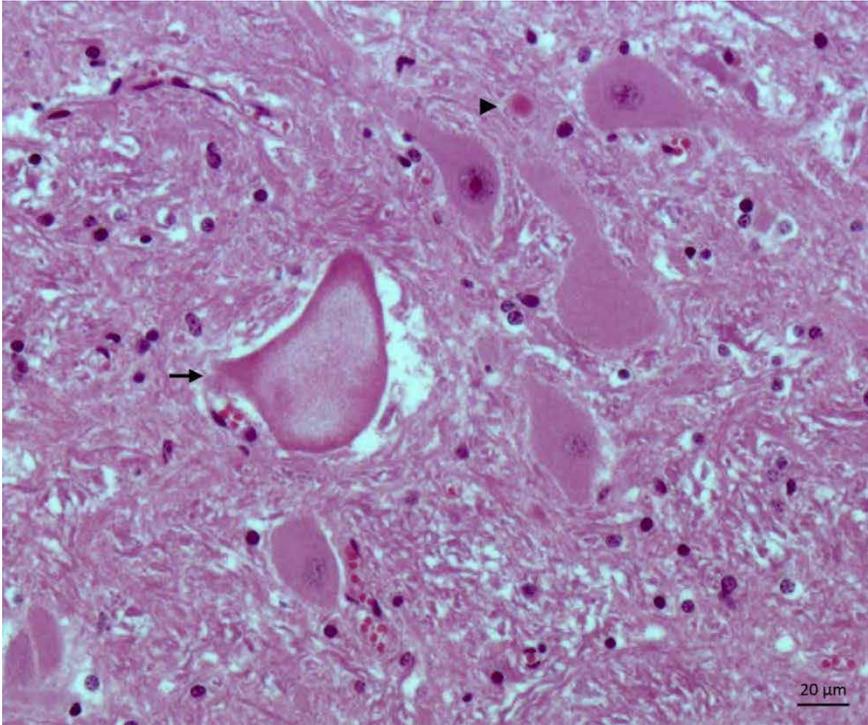


Figura 40- *Propriedade F*, Bovino 4. Neurônio cromatolítico muito tumefeito (seta); outros neurônios com cromatólise, cariólíticos (cornos ventrais da medula espinhal) HE Obj.40.

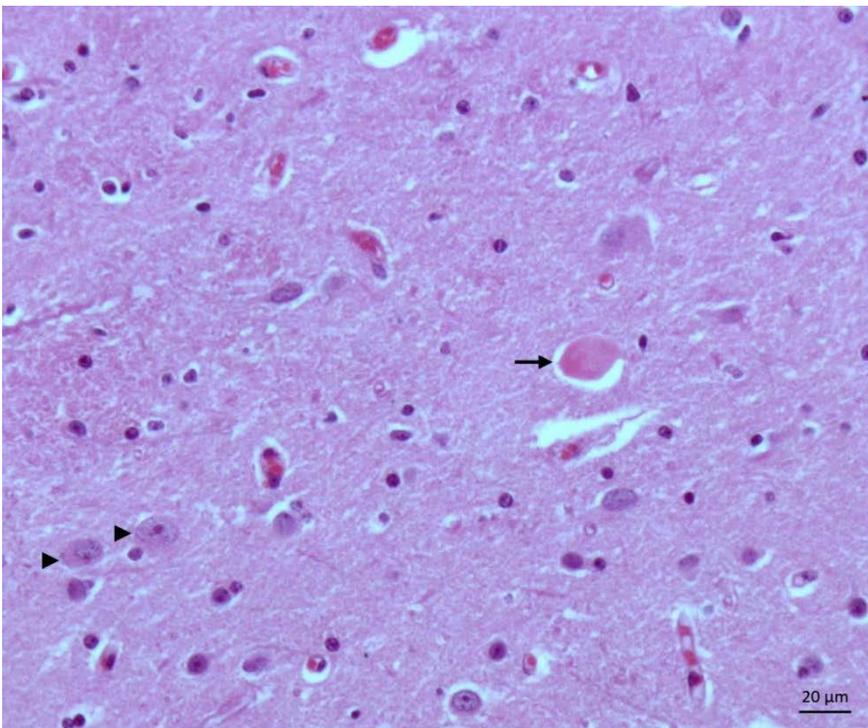


Figura 41- *Propriedade F*, Bovino 4. Neurônio necrótico (núcleo caudato) HE Obj.40.

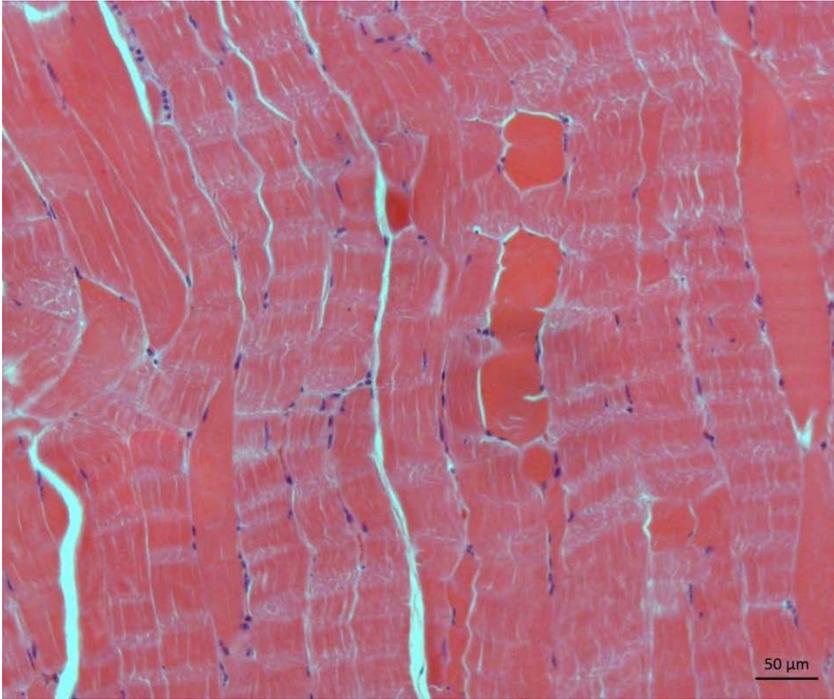


Figura 42- *Propriedade D*, Bovino 4. Hialinização (necrose) de fibras musculares esqueléticas cortadas longitudinalmente. HE. Obj 20.

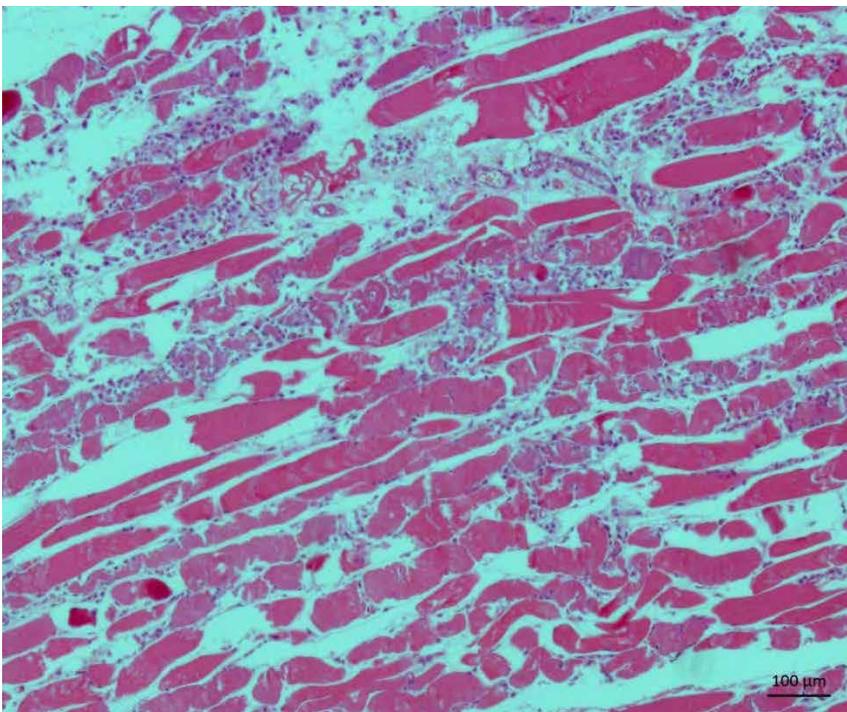


Figura 43- *Propriedade F*, Bovino 4. Necrose muscular polifásica com mineralização distrófica. HE Obj 10.

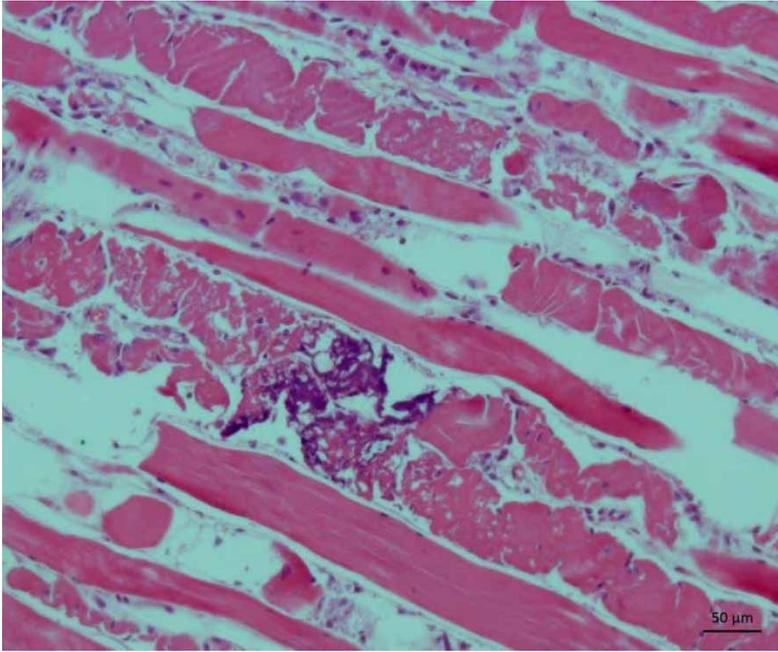


Figura 44- *Propriedade F*, Bovino 4. Necrose muscular hialina e flocular, com mineralização distrófica. HE Obj.20.

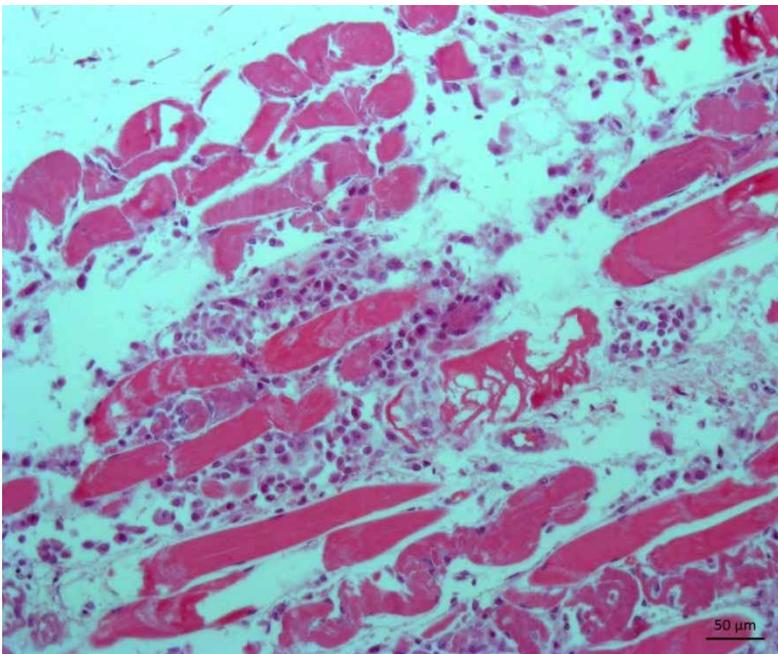


Figura 45- *Propriedade F*, Bovino 4. Necrose coagulativa de fibras musculares esqueléticas. Notar infiltração de células mononucleares em meio a detritos necróticos (macrófagos e células satélites) HE Obj. 20; outro campo, lesão mais adiantada.

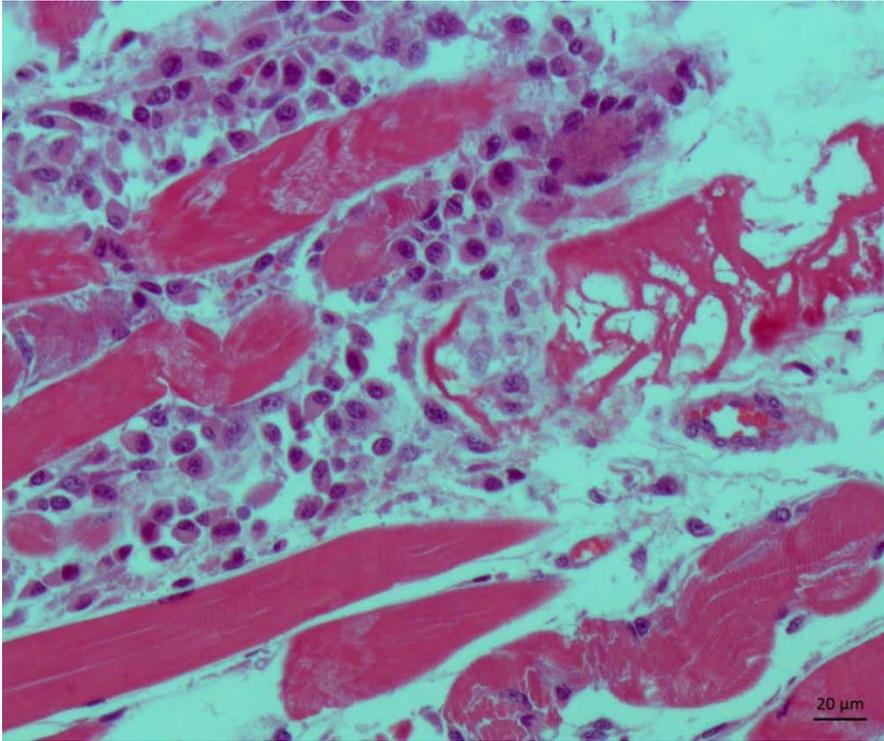


Figura 46- *Propriedade F*, Bovino 4. Maior aproximação. HE Obj.40.

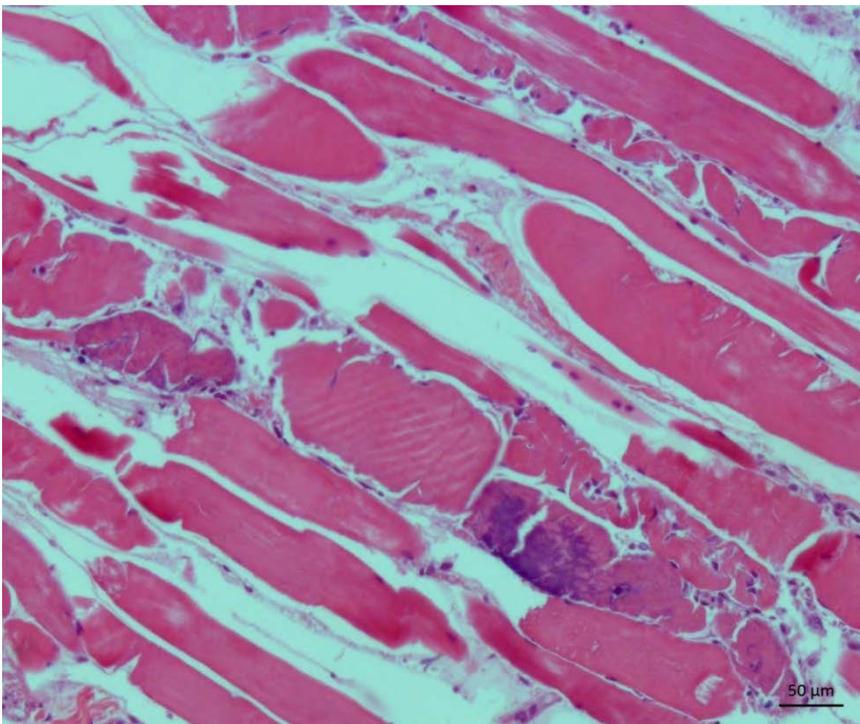


Figura 47- *Propriedade F*, Bovino 4. Necrose muscular com mineralização HE Obj.20.

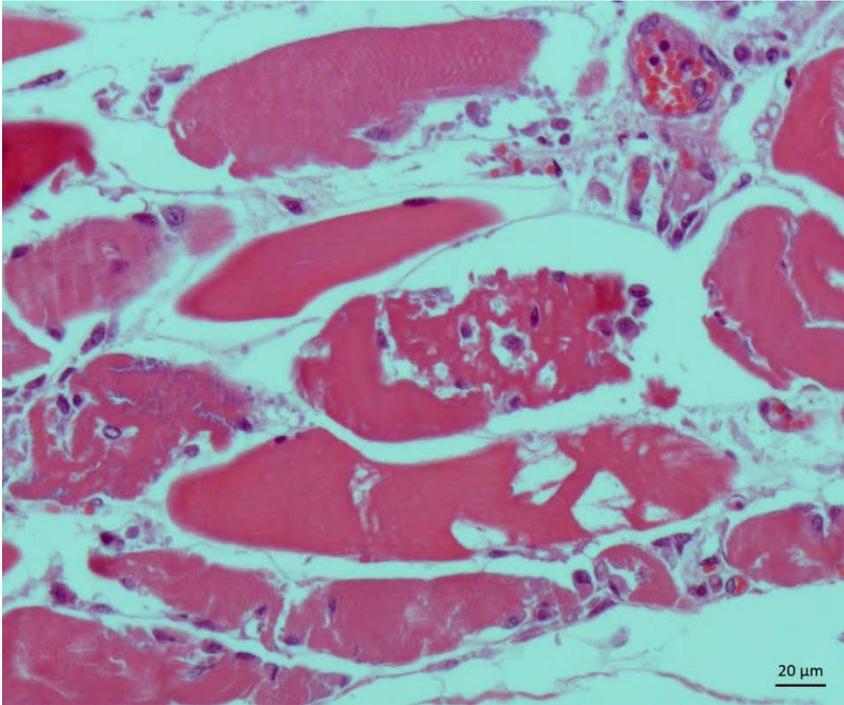


Figura 48- *Propriedade F*, Bovino 4. Necrose muscular hialina e flocular. HE. Obj.40.

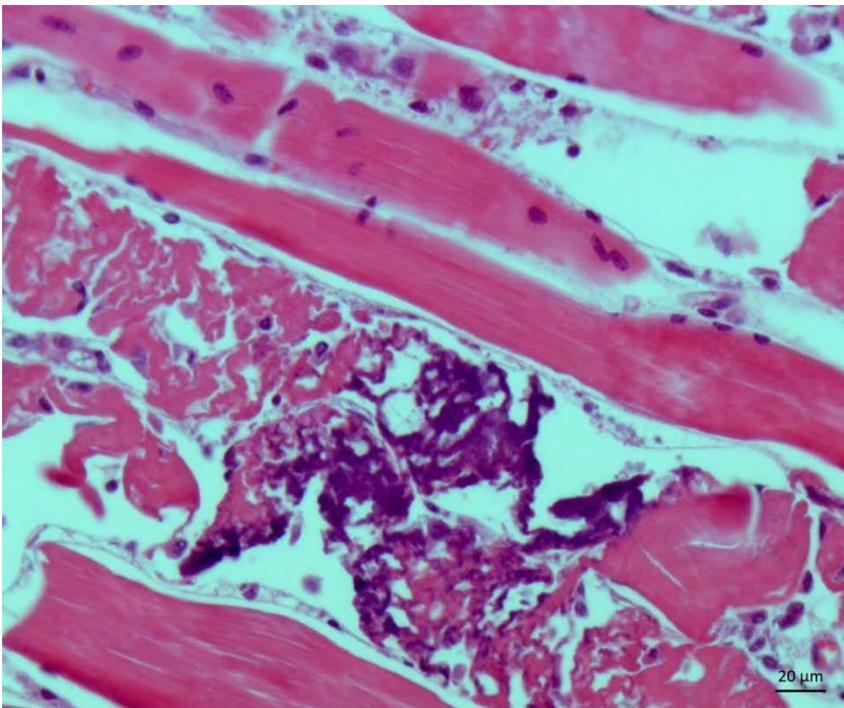


Figura 49- *Propriedade F*, Bovino 4. Necrose muscular hialina e flocular com mineralização HE Obj.40.

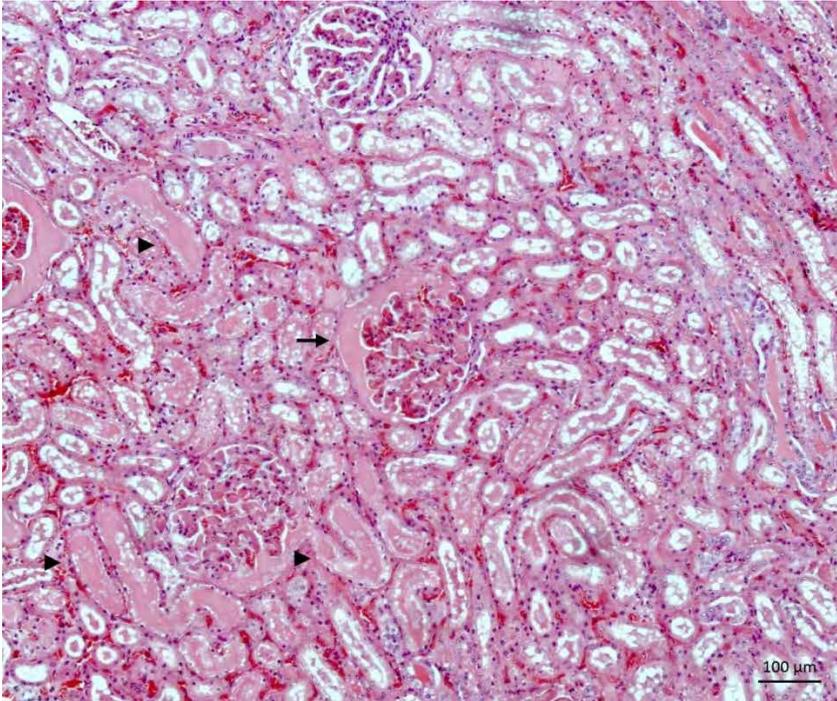


Figura 50- *Propriedade F*, Bovino 9. Nefrose mioglobinúrica; marcado aumento da filtração glomerular (seta) com dilatação dos túbulos por excesso de filtrado (cabeça de seta) HE Obj.10.

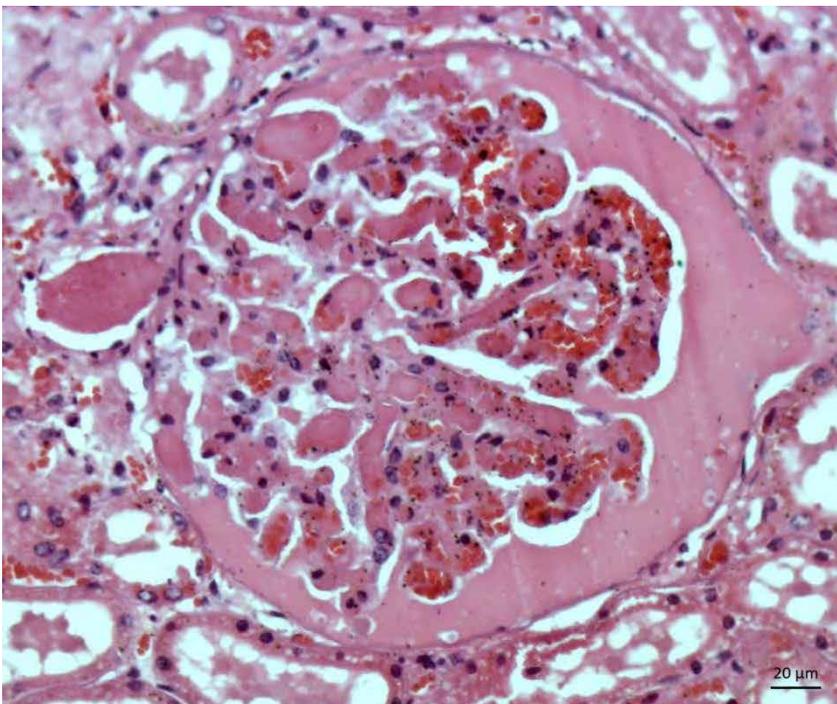


Figura 51- *Propriedade F*, Bovino 9. Nefrose mioglobinúrica (detalhe) HE Obj.63.

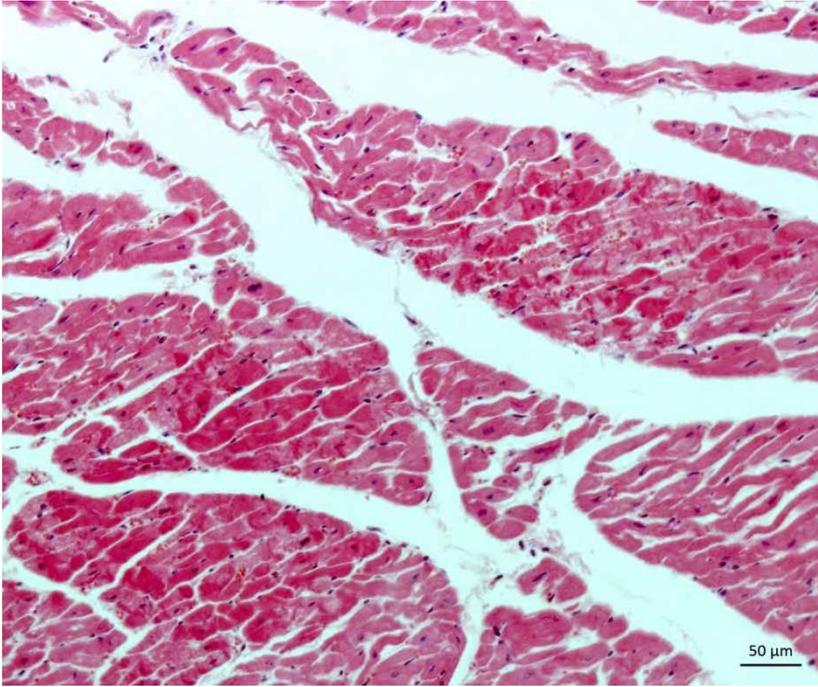


Figura 52- *Propriedade F*, Bovino 9. Área de necrose coagulativa hialina e flocular (miocárdio) HE Obj.20.

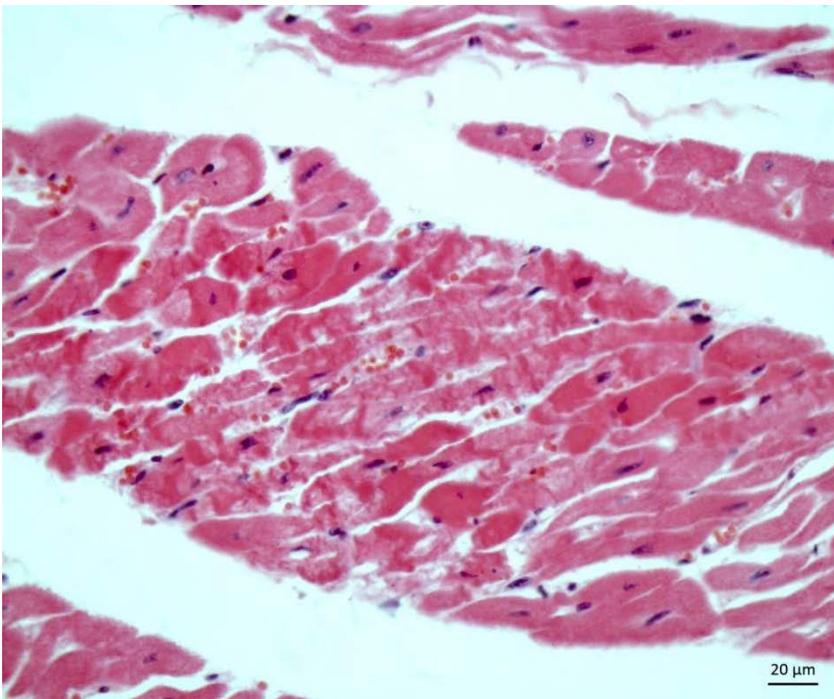


Figura 53- *Propriedade F*, Bovino 9. Área de necrose coagulativa hialina e flocular (miocárdio) HE Obj.40.

#### **4.4 Lectina-histoquímica e imuno-histoquímica**

Não foi observada reatividade específica das lectinas utilizadas com os neurônios "tumefeitos/vacuolizados".

A técnica de imuno-histoquímica empregada para o diagnóstico diferencial da encefalopatia espongiforme bovina (EEB) em um animal (Bovino 4) da Propriedade D foi negativa (Anexo 2).

#### **4.5 Micologia e micotoxicologia**

O cultivo de amostras de cevada coletadas nas *Propriedades D e F* revelou colônias de *A. clavatus* com aspecto granular, coloração azul esverdeada (Figura 63 a,b,c,d) e, microscopicamente, conidióforos com típicas vesículas em forma de clava, recobertas por fiáides curtas e conídios azul esverdeados (Figura 64).

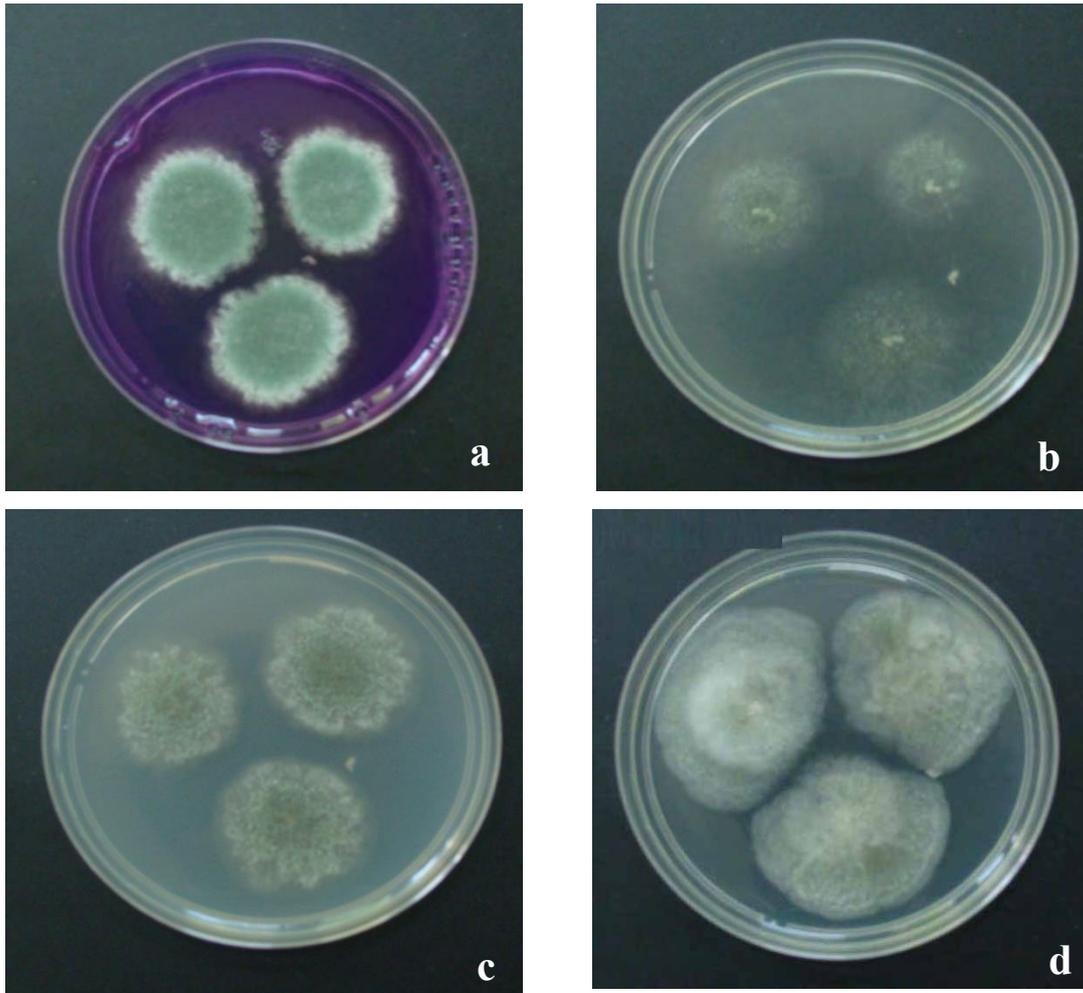


Figura 54- Aspecto macroscópico da colônia de *A. clavatus* em diferentes meios de cultura; a- Meio de Creatina Sacarose Ágar (CREA), b- Meio de Agar Extrato de levedura Czapek com 20% de sacarose (CY20S), c- Meio de Ágar Extrato de levedura (CYA), e- Meio de Agar Extrato de Malte (MEA).



Figura 55- Aspectos microscópicos característicos do fungo *A. clavatus*. Vesícula em forma de clava, recoberta por fiáldes curtas e conídios azuis esverdeados.

Os resultados das análises micotoxicológicas realizadas em amostras de cevada e pão, utilizados na alimentação dos animais da *Propriedade F*, surto 4 encontram-se no Quadro 2.

Quadro 2- Análises micotoxicológicas realizadas em amostras de cevada e pão, utilizados na alimentação dos animais da *Propriedade F*, surto 4.

Amostra Scan 1 cevada pasto	Amostra Scan 2 cevada tanque 05/07/16	Amostra pão 28/06/16	Metabólitos de Fungos
ácido penicílico	ácido penicílico	-	metabólitos de <i>Penicillium</i>
esterigmatocistina	esterigmatocistina	-	metabólitos de <i>Aspergillus</i>
-	ácido giberélico	-	metabólitos de <i>Fusarium</i>
-	citreoviridina	-	metabólitos de <i>Fusarium</i>
toxina HT-2	toxina HT-2	toxina HT-2	metabólitos de <i>Fusarium</i>
beauvericina	beauvericina	beauvericina	metabólitos de <i>Fusarium</i>
aurofusarina	aurofusarina	-	metabólitos de <i>Fusarium</i>
eniatina A	eniatina A	-	metabólitos de <i>Fusarium</i>
eniatina A1	eniatina A1	-	metabólitos de <i>Fusarium</i>
eniatina B	eniatina B	eniatina B	metabólitos de <i>Fusarium</i>
eniatina B1	eniatina B1	eniatina B1	metabólitos de <i>Fusarium</i>
eniatina B2	eniatina B2	-	metabólitos de <i>Fusarium</i>
eniatina B3	eniatina B3	-	metabólitos de <i>Fusarium</i>
zearalenona	zearalenona	zearalenona	metabólitos de <i>Fusarium</i>
neosolaniol	-	zearalenona 4 sulfato	metabólitos de <i>Fusarium</i>
-	-	fumonisina B1	metabólitos de <i>Fusarium</i>
-	-	moniliformina	metabólitos de <i>Fusarium</i>
-	-	deoxinivalenol	metabólitos de <i>Fusarium</i>
alternariol	alternariol	alternariol	metabólitos de <i>Alternaria</i>
alternariol metil éter	alternariol metil éter	alternariol metil éter	metabólitos de <i>Alternaria</i>

\*113 Substâncias pesquisadas.

No Quadro 2 verifica-se que, na presente análise não foram detectadas as principais toxinas produzidas por *Aspergillus clavatus* inculpadas pelos efeitos deletérios dessa toxicose.

#### **4.6 Exames complementares**

A bioquímica sanguínea realizada em quatro animais (Bovinos 8, 11, 12 e 13) sintomáticos e sobreviventes da Propriedade F (surto 4), revelou um aumento significativo da enzima lactato desidrogenase (LDH) em todos os animais testados. O Bovino 12 também apresentou um aumento dos níveis das enzimas aspartato-aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK). Os resultados completos dos exames encontram-se no Anexo 3

#### **4.7 Reprodução experimental**

Os sinais clínicos do ovino utilizado no experimento a campo iniciaram-se no 3º dia após a contenção para a administração da cevada através de sonda ruminal. O animal apresentou tremores intermitentes na região do flanco, períneo e da musculatura do quadríceps. Inicialmente, os tremores eram bem discretos e pouco perceptíveis quando em repouso, mas foram intensificando com o decorrer dos dias, apresentando hiperestesia, principalmente em resposta ao toque e a estímulos sonoros.

Os membros pélvicos mantinham-se afastados com deslocamento do apoio para os membros torácicos que, ocasionalmente, estavam aproximados e com a cabeça posicionada abaixo da linha do corpo (Figura 65 a,b,c,d). Após o Teste HR ("head raising test"), com a cabeça erguida por um minuto, o animal também apresentou dispneia com respiração ofegante, mantendo a boca aberta por alguns instantes. Havia progressiva fraqueza nos membros pélvicos que se mantinham afastados e flexionados em demasia, levando a quedas, até mesmo com a movimentação espontânea. Nessa fase, após a queda mantinha-se em decúbito esternal por períodos mais prolongados, mas era capaz de levantar-se sozinho com certa agilidade. Com o agravamento do quadro clínico, era evidente a dificuldade em manter-se em estação, principalmente, manter a região pélvica alinhada com o corpo, que acabava por pender/girar sempre para o lado esquerdo, causando desequilíbrio e tremores nos membros torácicos. Apesar da marcada perda de peso, o animal manteve-se alerta até o final do experimento, com retenção do apetite até próximo da eutanásia, que ocorreu 11 dias após o início do experimento, seguida de necropsia. A bioquímica sanguínea revelou um aumento significativo das

enzimas aspartato amino-transferase (AST), creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH). O resultado do exame completo encontra-se no Anexo 4.



Figura 56 a, b, c, d- Experimento a campo, ovino ; a,b- membros pélvicos flexionados e afastados, com deslocamento do apoio para os membros torácicos; c,d- membros pélvicos afastados e torácicos unidos.

#### 4.7.1 Macroscopia e microscopia

Não havia alterações significativas na necropsia. As lesões microscópicas assemelham-se com as lesões encontradas no SNC dos bovinos dos surtos descritos, principalmente na medula espinhal e em alguns núcleos da base do cérebro.

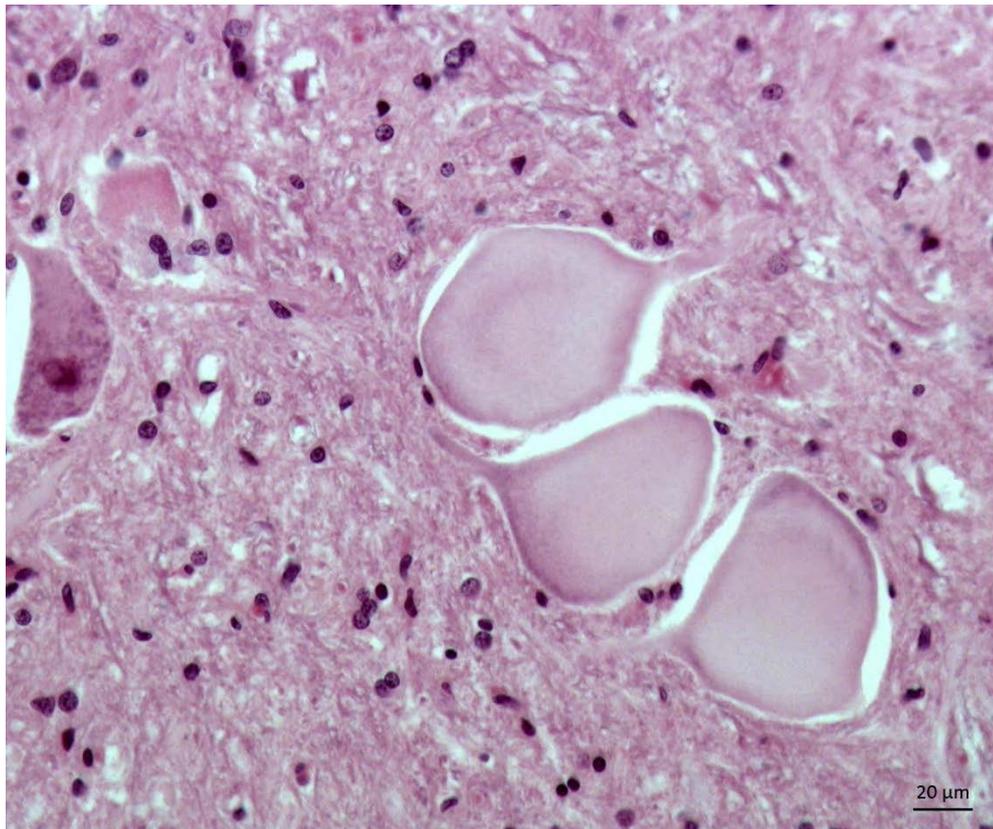


Figura 57- Reprodução experimental. Neurônios cromatolíticos, necróticos e tumefeitos. Cornos ventrais da medula espinhal. HE Obj. 40.

## 5. DISCUSSÃO

O diagnóstico da toxicose por *A. clavatus* associada ao consumo de “cevada”, em ambos os surtos, foi baseado no histórico comprovado de ingestão de significativas quantidades do referido resíduo de cervejaria, nos sinais clínicos, achados de necropsia compatíveis, nas lesões histológicas características dessa intoxicação. Além disso, foi confirmado pela identificação micológica do agente no substrato ingerido. Adicionalmente, foi reproduzido o quadro clínico patológico em ovelhas que consumiram amostras de cevada, coletadas em duas das propriedades investigadas.

No campo epidemiológico, há a evidência, em todos os surtos, que só adoeceram os animais que ingeriram a cevada contaminada. O tempo de evolução clínica dos ovinos que vieram a óbito nesses surtos, variável entre 3 e 18 dias, também é compatível com o descrito para a toxicose em questão (LORETTI et al., 2003). Em todos os surtos registraram-se casos de recuperação lenta, com observação de sequelas, mesmo que discretas (BEZERRA JÚNIOR, 2009a; MCKENZIE et al., 2004; EL-HAGE & LANCASTER, 2004), conforme vem sendo descrito para essa toxicose.

Os índices de morbidade, a mortalidade e a letalidade verificados nos surtos do presente trabalho variaram de 41,42% a 73,08%, 33,33% a 69,23% e 51,11% a 94,73%, respectivamente, são compatíveis com o descrito em trabalhos anteriores (KELLERMAN et al., 1984; GILMOUR et al., 1989; VAN DER LUGT et al., 1994; LORETTI et al., 2003; EL-HAGE & LANCASTER, 2004). A ocorrência de novos casos e óbitos após a suspensão da cevada na alimentação dos animais das propriedades envolvidas nos surtos do presente trabalho foi semelhante à descrição de outros autores (GILMOUR et al., 1989; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; BEZERRA JÚNIOR, 2009). Na *Propriedade F*, dois novos casos ocorreram até 9 dias após a suspensão da cevada. EL-HAGE & LANCASTER, 2004 descrevem a ocorrência de novos casos após a remoção do alimento contaminado por um período de até 18 dias.

Ainda no que diz respeito ao quadro clínico, também há estrita similaridade com o verificado em bovinos que ingerem alimentos contaminados com *A. clavatus*. Os sinais clínicos descritos nos surtos aqui estudados não diferem essencialmente dos relatados em surtos anteriores e são caracterizados por um quadro predominantemente locomotor/proprioceptivo/sensorial, na maioria das vezes, com retenção do apetite - dado importante para o estabelecimento do diagnóstico diferencial. No estudo

experimental, os ovinos evidenciaram marcada “fraqueza” muscular, tremores, hiperestesia ao toque e o posicionamento dos membros pélvicos afastados em estação e ao caminhar, sinais clínicos semelhantes ao já descrito por outros autores (BEZERRA JÚNIOR et al., 2009b).

As características das lesões macroscópicas observadas na musculatura esquelética dos animais relatados em nosso estudo assemelham-se ao reportado na literatura (KELLERMAN et al., 1976; LORETTI et al., 2003), especialmente no caso do bezerro necropsiado na *Propriedade E* que apresentou uma evolução clínica de 16 dias. Segundo KELLERMAN et al. (1976; 2005), as lesões são mais frequentes em animais que apresentam sinais clínicos por longos períodos. Entretanto, nos Bovinos 3 e 4 da *Propriedade F* que apresentaram apenas 4 dias de evolução clínica, lesões macroscópicas na musculatura esquelética também foram encontradas.

As áreas focais pálidas extensas encontradas nos músculos papilares e no miocárdio do ventrículo esquerdo dos Bovinos 3 e 4. da *Propriedade F*, também correspondem ao descrito por Kellerman et al., 1976; 2005, entretanto, essas lesões correspondiam apenas em parte à microscopia. As áreas pálidas provavelmente constituíam nesses animais, apenas áreas em que havia menor fluxo sanguíneo, daí a palidez localizada. No entanto, havia na microscopia áreas de necrose no miocárdio do Bovino 9 da mesma propriedade.

Já as lesões histológicas verificadas, em especial, no sistema nervoso central em todos os animais necropsiados nos quatro surtos e nos ovinos da reprodução experimental, se não são patognomônicas, podem ser consideradas como muito típicas.

O diagnóstico diferencial da neurotoxicose por *A. clavatus* envolve uma série de enfermidades com predominância de sinais clínicos neurológicos, neuromusculares e musculares, das mais diversas etiologias infecciosas e toxicológicas. Tais características podem concorrer para um diagnóstico equivocado ou, até mesmo, justificar os poucos relatos no Brasil (LORETTI et al., 2003).

Nesse contexto, faz-se necessário levar em consideração outras enfermidades que compartilham manifestações clínicas com alguma semelhança, como o botulismo, por exemplo. Sinais clínicos considerados como frequentes e importantes para o diagnóstico dessa enfermidade são paralisia flácida dos membros, respiração abdominal,

paralisia da cauda, incoordenação motora, diminuição do tônus da língua e tentativas de levantar sem êxito (RIET-CORREA et al., 2007; BARROS et al., 2006; DUTRA, 2001; DÖBEREINER et al., 1992). De acordo com Stöber (1984), o quadro de paralisia flácida progressiva, aliado ao estado mental aparentemente normal e respiração bifásica na inspiração é característico da intoxicação botulínica e auxilia sobremaneira no estabelecimento do diagnóstico diferencial de outras enfermidades do sistema nervoso dos bovinos. Contudo, a ausência de reflexo panicular e de sensibilidade no membro posterior direito, a sensibilidade diminuída no membro posterior esquerdo e ausente nos membros anteriores, verificados no Bovino 4D, indicam certo grau de comprometimento do sensorio, o que não ocorre no botulismo. Bezerra et al., 2009 também descreveram a diminuição e ausência da sensibilidade cutânea nas porções posteriores do corpo de três bovinos na neurotoxicose por *A. clavatus*. Além disso, em nosso experimento a campo, o ovino também apresentou diminuição da sensibilidade cutânea do membro pélvico esquerdo durante o exame neurológico que antecedeu a eutanásia. A redução da sensibilidade cutânea observada, principalmente, nas porções posteriores dos animais, pode estar relacionada a lesões nos gânglios espinhais e suas projeções centrais (DE LAHUNTA, 1983).

É importante lembrar que, embora possam eventualmente estar associados à ingestão de subprodutos de cervejaria (HAAGSMA, 1991; STÖBER, 2005), no Brasil os casos de botulismo geralmente estão relacionados à deficiência de fósforo. Portanto, o histórico e/ou a observação de bovinos ingerindo ossos, além da investigação sobre a origem da água de dessedentação dos animais, são dados epidemiológicos importantes para o diagnóstico (BRUST et al., 2015).

Considerando-se ainda que o *botulismo* ocorre quando os bovinos tem acesso a uma fonte de toxina e que esta, geralmente, está localizada em uma determinada área da propriedade, o diagnóstico pode ser realizado com base na epidemiologia (ingestão da toxina), quadro clínico e *ausência de lesões macroscópicas e histológicas* (DUTRA, 2001; DUTRA et al., 2005, BARROS et al., 2006; GALIZA et al., 2010). A confirmação definitiva, contudo, implica na detecção da toxina botulínica no conteúdo do rúmen e do intestino ou no fígado, que pode ser feita por microfixação de complemento (DUTRA et al., 1993).

Por ser uma das mais importantes causas de mortes em bovinos no Brasil (TOKARNIA et al., 2012) e cursar com ampla variedade de sinais clínicos, a *raiva dos herbívoros* sempre deve ser considerada no diagnóstico diferencial das doenças do SNC (LIMA et al., 2005). Na maioria dos casos, o quadro clínico caracteriza-se por incoordenação dos membros pélvicos, com evolução para paresia e paralisia, ausência de reflexo com relaxamento e protusão do ânus, paralisia da cauda, tremores da cabeça, diminuição da visão, opistótono, bruxismo, salivação, fezes ressequidas e escassas, retenção e incontinência urinária e mugidos roucos (MORI & LEMOS, 1998; LANGOHR et al., 2003). Características epidemiológicas como a ocorrência de casos de raiva em diferentes pastos, afetando espécies e faixas etárias diferentes, e também, propriedades vizinhas, com desfecho invariavelmente fatal são importantes para a elaboração da suspeita diagnóstica (FERNANDES & RIET-CORREA, 2007). Histologicamente observa-se meningoencefalite não supurativa em praticamente todos os casos e corpúsculos de inclusão citoplasmática nas células de Purkinje em boa parte deles, pelo menos quando a enfermidade culmina com a morte do animal, sem abreviar-se a evolução pela eutanásia (LANGOHR et al. 2003). Na neurotoxicose por *A. clavatus* predominam as lesões degenerativo-necróticas de grandes neurônios dos cornos ventrais da medula espinhal e núcleos específicos da medula oblonga, mesencéfalo e tálamo (GILMOUR et al., 1989; KELLERMAN et al., 1976; 1984; 2005; LORETTI et al., 2003; COLODEL et al., 2004; EL-HAGE & LANCASTER, 2004; MCKENZIE et al., 2004; SABATER-VILAR et al., 2004). Em nosso trabalho, nas seis propriedades investigadas, apenas os animais que ingeriram cevada adoeceram e em todos os surtos houve um percentual de animais que se recuperaram.

Em casos de intoxicações por plantas que causam doenças do armazenamento lisossomal em bovinos, como por exemplo, *Sida carpinifolia*, *Solanum fastigiatum*, *Ipomoea carnea subesp. fistulosa* e *Turbina cordata*), o quadro clínico é acompanhado por vacuolização citoplasmática em células de diversos tecidos, inclusive neurônios, particularmente, os do córtex cerebelar e cerebral, tálamo, mesencéfalo e medula espinhal. Há de se ter evidências da presença das referidas plantas na propriedade, bem como da ingestão pelos animais afetados, o que não ocorreu nos surtos aqui estudados. Embora presente na doença causada por *A. clavatus*, a vacuolização neuronal não tem sido observada no córtex cerebelar ou cerebral (BEZERRA JUNIOR et al., 2009). Embora os neurônios de Purkinje tenham sido poupados nos casos do presente estudo,

em um dos casos aqui apresentados havia lesões de cromatólise em neurônios piramidais do córtex cerebral. O envolvimento do córtex cerebral é frequente em doenças do neurônio motor em humanos (SUMMERS et al., 1995).

Apesar das muitas semelhanças clínicas com as síndromes tremorgênicas causadas por intoxicações por *Claviceps paspali*, *Stenocarpella maydis*, *Phalaris angusta*, *Cynodon dactylon*, *Lolium perenne* e *Ipomoea asarifolia*, na maioria dos casos, não há lesões patológicas relacionadas, exceto na intoxicação por *Phalaris* spp., na qual a lesão patológica característica é a pigmentação cinza-esverdeada no sistema nervoso central (TOKARNIA et al., 2000; GAVA et al.1999).

É importante mencionar que intoxicações por plantas hepatotóxicas por vezes cursam com marcada sintomatologia de origem nervosa - encefalopatia hepática - contudo, nesses casos, as lesões cerebrais são de natureza - edema das bainhas de mielina- e distribuição diversas- vacúolos (espongiose) extra citoplasmáticos, sobretudo na junção entre substância branca e substância cinzenta, e tratos nervosos na base do cérebro, além de que a lesão hepática concomitante se encarrega de dirimir quaisquer dúvidas.

Os sinais clínicos, predominantemente locomotores, com ênfase no clássico “emboletamento” dos membros pélvicos que ocorrem na toxicose por *A. clavatus* também podem ser confundidos com a manifestação clínica de casos de leucose multicêntrica com envolvimento da medula espinhal ou da cauda equina. Neste caso, a incoordenação, paresia e paralisia dos membros pélvicos são causadas por compressão exercida por massas neoplásicas localizadas no espaço epidural (RIET-CORREA et al., 2007, BARROS et al., 2006). O aumento de linfonodos verificado, muitas vezes, já à inspeção e, principalmente, a necropsia é crucial na diferenciação.

Em um levantamento realizado por Galiza et al. (2010) sobre doenças de sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino, três casos de tuberculose com comprometimento do SNC foram diagnosticados. Os sinais clínicos em um dos animais afetados e que reagiu negativamente à tuberculinização incluíram incoordenação, debilidade e diminuição da sensibilidade dos membros pélvicos, postura de cão sentado e incontinência urinária. Segundo Barros et al. (2006), lesões de tuberculose no SNC ocorrem em animais que adquirem a infecção pela via congênita. Efetivamente, a similaridade dessas manifestações clínicas com as produzidas pela intoxicação por *A.*

*clavatus* pode levar à inclusão da tuberculose no diagnóstico diferencial da referida toxicose. Entretanto, as alterações macroscópicas e histológicas presentes no SNC, medula espinhal, pulmões e linfonodos de animais tuberculosos são inequívocas. Esses casos são raros e, por outro lado, a epidemiologia é bem diversa.

A presença de áreas esbranquiçadas em porções da musculatura esquelética, frequentemente descritas em casos de toxicose por *A. clavatus* em bovinos com o quadro clínico compatível, sem dúvida, reforça muito a possibilidade de tratar-se desse tipo de intoxicação. No entanto, quando há lesões musculares, a toxicose por *A. clavatus* deve ser diferenciada de outras enfermidades que causam miopatias esqueléticas difusas e resultam em incapacidade de locomoção, paresias ou debilidade muscular difusa (astenia, fraqueza) como as causadas por intoxicação por antibióticos ionóforos, intoxicação por *Senna (Cassia) occidentalis*, *Senna obtusifolia* e ainda pela deficiência de vitamina E/selênio, conhecida também como distrofia muscular nutricional (DMN) ou "doença do músculo branco". Nestas miopatias, no entanto, não há lesões no sistema nervoso central (VAN VLEET & VALENTINE, 2007).

Em bovinos, a intoxicação por antibióticos ionóforos tem como tecidos-alvo a musculatura esquelética e o miocárdio (ROLLINSON et al., 1987; WOUTERS et al., 1997b). Os sinais clínicos mais frequentes são anorexia, diarreia, incoordenação motora, andar rígido e relutância em mover-se, tremores musculares, mioglobínúria, depressão, emaciação e decúbito (SCHWEITZER et al., 1984). O coração tende a ser o órgão mais afetado com áreas e estrias pálidas no miocárdio e hemorragias subepicárdicas e miocárdicas (VAN VLEET et al., 1983; WOUTERS et al., 1997a). Verificam-se também, áreas pálidas em músculos esqueléticos, principalmente naqueles de movimentos mais intensos como diafragma e quadríceps femoral (WOUTERS et al., 1997a). O diagnóstico da intoxicação por antibióticos ionóforos deve ser baseado no histórico de acesso a estas substâncias, nas diferentes categorias afetadas, nos achados clínicos e na observação de miopatia e cardiomiopatia degenerativo-necrótica. A detecção e quantificação da substância no alimento ingerido confirma o diagnóstico. Na intoxicação por *A. clavatus*, a miopatia quando presente é sempre acompanhada das lesões neuronais na histopatologia, o que não ocorre na intoxicação por ionóforos (NOGUEIRA et al., 2009; FRANÇA et al., 2009). Por sua vez, lesões cardíacas são incomuns na doença relacionada ao *A. clavatus*, embora pequenos focos de necrose no miocárdio possam ocorrer em alguns animais que sobrevivem por longos períodos

(KELLERMAN et al., 1976; 2005). No presente trabalho, durante o surto 4, o Bovino 9F apresentou urina de coloração vermelho-acastanhada que, submetida ao teste de precipitação por sulfato de amônio, foi sugestiva para mioglobinúria. À microscopia, havia também nefrose presumivelmente, mioglobinúrica com dilatação dos túbulos por excesso de filtrado e necrose coagulativa do miocárdio, embora não fossem observadas lesões nos músculos esqueléticos avaliados. Entretanto, adicionalmente, os animais acometidos nesse surto que se encontravam em recuperação, apresentaram aumento significativo dos níveis plasmáticos da enzima LDH e um deles, concomitante ao elevado nível de CK, o que seria indicativo de lesão muscular. Na literatura não foram encontradas citações sobre mioglobinúria na neurotoxiose por *A. clavatus* e como a patogênese das lesões musculares ainda não está esclarecida (GILMOUR et al., 1989; LORETTI et al., 2003), talvez esse seja um achado incomum dessa enfermidade. Face à ausência de alterações macro e microscópicas na musculatura estriada esquelética nesse animal, a relação entre a lesão cardíaca e o estabelecimento da nefrose permanece obscura.

A deficiência de vitamina E/selênio afeta geralmente animais jovens (2 a 4 meses) com índice elevado de crescimento e produz lesões nos músculos esqueléticos e cardíaco, que são acentuadas pela calcificação (BARROS, 1988). Lesões musculares semelhantes são relatadas na intoxicação por *A. clavatus*, algumas vezes inclusive, acompanhadas de mineralização (LORETTI et al., 2003; BEZERRA JÚNIOR et al., 2009). Desta forma, a categoria animal afetada e as lesões degenerativo-necróticas em neurônios são importantes para a diferenciação.

A intoxicação por *Senna (Cassia) occidentalis* e *S. obtusifolia* acomete principalmente bovinos acima de um ano de idade. Os principais sinais clínicos são diarreia, mioglobinúria, fraqueza muscular, ataxia dos membros posteriores, relutância em mover-se, decúbito esternal, lateral, e morte. À necropsia, verificam-se áreas pálidas, focais e coalescentes na musculatura esquelética e estrias esbranquiçadas no miocárdio. Microscopicamente, há vários graus de degeneração, necrose e ruptura de fibras musculares esqueléticas, por vezes, associados a processos proliferativos e regenerativos (CARVALHO et al., 2014), contudo, lesões histológicas no SNC não ocorrem.

Embora a lesão predominante em ruminantes intoxicados por *A. clavatus* seja semelhante à cromatólise central, alguns neurônios podem apresentar também vacuolização citoplasmática que reforçada por similaridades no quadro clínico, pode ser confundida com as alterações descritas em casos de encefalopatias espongiiformes transmissíveis, como a encefalopatia espongiiforme bovina (EEB) e scrapie em ovinos, aumentando a importância em estabelecer o diagnóstico diferencial (COLODEL et al., 2004). Nestes casos, embora alguns autores considerem essencial a imunistoquímica é crucial para uma diferenciação inequívoca (LORETTI et al., 2003, BARROS et al., 2006; RIET-CORREA et al., 2007)

É importante ressaltar, que a simples evidência do isolamento de *A. clavatus* nas amostras destinadas à alimentação dos animais não necessariamente o torna agente causal dessa enfermidade, tendo em vista, a possibilidade das cepas não serem toxigênicas. Além disso, alimentos com ausência de contaminação fúngica visível, também podem conter quantidades suficientes de micotoxinas capazes de causar intoxicação (HUMPHREYS, 1988). No presente estudo, a confirmação da toxidez da cevada contaminada com *A. clavatus* foi obtida pela reprodução experimental do quadro clínico patológico através da administração da cevada utilizada em duas das propriedades a ovinos, à semelhança de trabalhos conduzidos por outros autores (BEZERRA JÚNIOR et al., 2009b). Além disso, todos os animais necropsiados evidenciaram no SNC as típicas lesões degenerativas descritas para toxicose por *A. clavatus*.

Análises micotoxicológicas complementares, como extração e detecção de micotoxinas por cromatografia líquida em camada delgada (TLC) ou por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) também podem ser conduzidas e devem ser avaliadas no sentido de reforçar o diagnóstico (LOPEZ-DIAZ & FLANNIGAN, 1997). *A. clavatus* tem sido apontado como produtor de diversas micotoxinas, como a patulina, brefeldina A, citocalasina, E e K, ascladiol, clavatul, ácido kógico e diversas substâncias tremorgênicas como triptoquivalina, triptoquivalona, nortriptoquivalona e gliantripina (BEZERRA JÚNIOR, 2009a *apud* KELLERMAN et al., 1976, 1988; VARGA et al., 2003; SABATER-VILAR et al., 2004). Nenhuma delas, porém, foi testada em ruminantes (MCKENZIE et al., 2004) tampouco, isoladamente é capaz de reproduzir o quadro clínico na totalidade, principalmente, as lesões neuronais. Destas, apenas a brefeldina A tem sido apontada como capaz de afetar seletivamente neurônios motores

(KIKUCHI et al., 2003). Mas não há experimentos, nem pesquisa dessa toxina em surtos de intoxicação por *A. clavatus*. As toxinas tremorgênicas mimetizam parte do quadro clínico, mas não causam lesões neuronais como as descritas nesta toxicose. Em uma primeira análise, as principais toxinas produzidas por *A. clavatus* não foram detectadas nas amostras de cevada oriundas do nosso último surto, ocorrido em 2016. Novas análises permanecem em aberto e devem ser foco de estudos, ora em andamento.

Considerando as condições ideais para proliferação de fungos em geral, particularmente, em temperaturas superiores a 13°C, com intenso crescimento a 25°C para *A. clavatus* (LOPEZ-DIAZ & FLANNIGAN, 1997) e as temperaturas médias da Região Centro-Sul Fluminense e Médio Paraíba, não é incomum que tais temperaturas tenham sido atingidas à época em que os surtos ocorreram. Aliado ao fator climático, a questão do armazenamento da cevada nas propriedades rurais muitas vezes, está aquém das condições ideais no que tange à infraestrutura do tanque. Note-se que no surto 1, que envolveu 3 propriedades, a cevada era estocada em um buraco no chão de terra com paredes de bambu e cobertura de lona que, visivelmente, era incapaz de conferir ao subproduto, proteção contra intempéries climáticas e da própria umidade do solo, onde se encontrava em contato direto. Mesmo em tanques de alvenaria, faz-se necessário um sistema de drenagem eficiente, haja visto que em todas as propriedades investigadas, o emprego da cevada úmida é o comumente utilizado. Barros et al. (2006) preconizam o uso da cevada seca como o mais seguro. Entretanto, os custos de processamento tem limitado o fornecimento do subproduto nesta condição.

O tempo de estocagem da cevada na propriedade também pode ser crucial quanto ao risco de proliferação fungos, incluindo *A. clavatus* e o consequente estabelecimento da toxicose, tal como ocorreu na maioria dos surtos aqui apresentados. Contudo, determinar o momento em que a contaminação fúngica se estabeleceu em cada uma das propriedades investigadas é muito complexo, principalmente, sabendo-se que em todas as etapas, desde a germinação do grão de cevada até no destino final do subproduto de cervejaria, em condições propícias, a proliferação de cepas toxigênicas de *A. clavatus* pode ocorrer.

## 6. CONCLUSÕES

1- Conclui-se que o quadro clínico-patológico e os surtos foram decorrentes da ingestão de toxinas de *Aspergillus clavatus* na “cevada” utilizada na alimentação dos animais.

2- Considerando a utilização do subproduto na forma úmida, a redução do tempo de estocagem, bem como a utilização de instalações que permitam a drenagem do material armazenado, pode reduzir sobremaneira os riscos de contaminação fúngica e possíveis intoxicações.

3- A enfermidade foi reproduzida em ovinos utilizando a cevada obtida de dois dos surtos estudados com a manifestação dos sinais clínicos e das lesões histológicas no SNC típicas dessa toxicose.

4- Trata-se do primeiro registro da enfermidade no Estado do Rio de Janeiro.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, J.A.B.; MENDONÇA, C.I. Acidose láctica ruminal. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.; BORGES, J.R. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**, v. 2. 3ª Ed. Pallotti, Santa Maria, 694p. 2007.
- BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; LEMOS, R.A.A. **Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil**. AGNS Gráfica e Editora. São Paulo, 207p. 2006.
- BEZERRA JÚNIOR, P.S.; RAYMUNDO, D.L.; SPANANBERG, A.; CORRÊA, A.M.R.; BANGEL JÚNIOR, J.J.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. Neurotoxicose em bovinos associada ao consumo de bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 220-228, 2009a.
- BEZERRA JÚNIOR, P.S.; SANTOS, A.S.; BANDARRA, P.M.; PEDROSO, P.M.O.C.; PAVARINI, S.P.; SPANANBERG, A.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. Intoxicação experimental por *Aspergillus clavatus* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 205-210, 2009b.
- BRENT, B.E. Relationship of acidosis to other feedlot ailments. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 930-935, 1976.
- BRUST, L.A.C. Intoxicação por etanol em “levedo de cerveja” em bovinos. **Tese de Doutorado** em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ. 68p, 2011
- BRUST, L.A.C.; ARAGÃO, A.P.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; GALVÃO, A.; FRANÇA, T.N.; GRAÇA, F.A.S.; PEIXOTO, P.V. Enfermidades em bovinos associadas ao consumo de resíduos de cervejaria. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35(12), p. 956-964, 2015.

- BÜCHI, G.; LUK, K.C.; KOBBE, B.; TOWNSEND, J.M. Four new mycotoxins from *Aspergillus clavatus* related to tryptoquivaline. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, p. 244-246, 1977.
- CABRAL FILHO, S.L.S.C. Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares e correlatas. Dissertação (Mestrado em Ciências) Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 82p. 1999.
- CALDAS S.A. **Comunicação pessoal**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.
- CARVALHO, A.Q.; CARVALHO, M.N.; VIEIRA, G.P.; SANTOS, A.C.; FRANCO, G.L.; POTT, A.; BARROS, C.S.L.; LEMOS, R.A.A. Intoxicação espontânea por *Senna obtusifolia* em bovinos no Pantanal Sul Matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34(2), p. 147-152, 2014.
- COLODEL, E.M.; SCHMITZ, M.; TRAVERSO, S.D.; SANCHES, E.M.C.; FERREIRO, F.; LORETTI, A.P.; CORREA, A.M.C.; SEITZ, A.L.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínicos e patológicos da doença neurológica de bovinos reproduzida pela administração de milho contaminado com *Aspergillus clavatus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, (Supl.), p. 16-17, 2004.
- DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 471p. 1983.
- DEMAIN, A.L.; HUNT, N.A.; MALIK, V.; KOBBE, B.; HAWKINS, H.; MATSUO, K.; WOGAN, G.N. Improved procedure for production of cytochalasin E and tremorgenic mycotoxins by *Aspergillus clavatus*. **Appl. Environ. Microbiol.** n. 31 (1), p. 138-140, 1976.

DIRKSEN, G. Enfermedades de los órganos digestivos y lapared abdominal. In: DIRKSEN, G.; GRUNDER, H.; STÖBER, M. **Medicina Interna y Cirugía del Bovino**. 4ª Ed. Buenos Aires: Inter- Médica, v. 1, p. 325-631, 2005.

DIRKSEN, G. **Indigestiones em el bovino**. Schnetztor-Verlag Konstanz, 77p. 1981.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER J.; DUTRA, I.S. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.**, v. 99(5), p. 188-190, 1992.

DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; SOUZA, A.M. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25(2), p. 115-119, 2005.

DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J.; ROSA, I.V.; SOUZA, L.A.A.; NONATO, M. Surtos de botulismo no Brasil associados à ingestão de água contaminada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21(2), p. 43-48, 2001.

DUTRA, I.S.; WEISS, H.E.; WEISS, H.; DÖBEREINER, J. Diagnóstico do botulismo em bovinos pela técnica de microfixação de complemento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 13(3/4), p. 83-86, 1993.

ELAM, C.J. Acidosis in feedlot cattle: practical observations. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 898-901, 1976.

EL-HAGE, C.M.; LANCASTER, M.J. Mycotoxic nervous disease in cattle fed sprouted barley contaminated with *Aspergillus clavatus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 10, p. 639-641, 2004.

FERNANDES, C.G.; RIET-CORREA, F. Raiva, p. 184-198. In: Riet-Correa F., Schild, A.L., Lemos, R.R.A., BORGES, J.R.J. (Eds), **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. Vol 1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, 2007.

- FLANNIGAN, B.; PEARCE, A.R. *Aspergillus* spoilage: spoilage of cereals and cereal products by the hazardous species *A. clavatus*. In: K.A. Powel, J. Peberdy and E. Renwich (editors), **Biology of Aspergillus**. Plenum press. New York, p. 115-127, 1994.
- FRANÇA, N.T.; NOGUEIRA, V.A.; YAMASAKI, E.M.; CALDAS, S.A.; TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. Intoxicação acidental por monensina em ovinos no Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29 (9), p. 743-746, 2009.
- GALIZA, G.J.N.; SILVA, M.L.C.R.; DANTAS, A.F.M.; SIMÕES, S.V.D. RIET-CORREA, F. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30 (3), 267-276, 2010.
- GAVA A., SOUSA R.S, DE DEUS M.S., PILATI C., CRISTANI J., MORI A.M. NEVES D.S. *Phalaris angusta* (Gramineae) como causa de enfermidade neurológica em bovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19(1), p. 35-38, 1999.
- GELBERG, H.B. Alimentary system. In: McGavin, M.D.; Zachary, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4<sup>a</sup> Ed. Missouri: Elsevier, p. 301-392, 2007.
- GILMOUR, J.S.; INGLIS, D.M.; ROBB.J.; MACLEAN, M.A. A fooder mycotoxicosis of ruminants caused by contamination of distillery by-product with *Aspergillus clavatus*. **The Veterinary Record**, v. 124, n. 6, p. 133-135, 1989.
- GNIADÉK, A. Cytotoxicity of *Aspergillus* fungi as a potential infectious threat. In: ROY, P. K.; RIJEKA, C. (Ed.). **Insight and control of infectious disease in global scenario**. London: Priti Kumar Roy. p. 231–248, 2012.
- GRANT, I.W.; BLACKADDER, E.S.; GREENBERG, M.; BLYTH, W. Extrinsic allergic alveolitis in Scottish maltworkers. **British Medical Journal**, v.1, p. 490-493, 1976.

- GRIFFITHS, G.L.; HILLER, P.; SUTHERLAND, R.J. Salinomycin poisoning in point of lay turkeys. **Aust. Vet. J.** v. 66 (10), p. 326-329, 1989.
- HAAGSMA, J. Botulism in cattle, a review. **Tijdschr. Diergeneeskd**, v. 116 (13), p. 663-669, 1991.
- HAAGSMA, J.; TER LAAK, E.A. Atypische gevallen van botulismus type B bij runderen, veroorzaakt door de bijvoeding van bierbostel. **Tijdschr. Diergeneeskd.** 103(6):312-325, 1978.
- HUMPREYS, D.J. Organic compounds, III: Miscellaneous. In: **Veterinary Toxicology.** 3<sup>a</sup> Ed. London: Baillière Tindall, p. 183, 1988.
- KELLERMAN, T.S.; COETZER, J.A.W.; NAUDÉ, T.W.; BOTHA, C.J. In **Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa.** 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press, Cape Town, p. 63-113, 2005.
- KELLERMAN, T.S.; COETZER, J.A.W.; NAUDÉ, T.W. **Plant Poisonings and Mycotoxicosis of Livestock in Southern Africa.** Oxford University Press, Cape Town, p. 67-69, 1988.
- KELLERMAN, T.S.; NEWSHOLME, S.J.; COETZER, J.A.W.; VAN DER WESTHUIZEN, G.C.A. A tremorgenic mycotoxicosis of cattle caused by maize sprouts infested with *Aspergillus clavatus*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 4, p. 271-274, 1984.
- KELLERMAN, T.S.; PIENAAR, J.G.; VAN DER WESTHUIZEN, G.C.A.; ANDERSON, L.A.P.; NAUDÉ, T.W. A highly fatal tremorgenic mycotoxicosis of cattle caused by *Aspergillus clavatus*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 3, p. 147-154, 1976.
- KIKUCHI, S.; SHINPO, K.; TSUJI, S.; YABE, I.; NINO, M.; TASHIRO, K. Brefeldin A-induced neurotoxicity in cultured spinal cord neurons. **J.Neurosci. Res.**v.71 (4), p. 591-599, 2003.

- KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 116 p, 2002.
- KROGH, N. Clinical and microbiological studies on spontaneous cases of acute indigestion in ruminants. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 4, p.27-40, 1963.
- LANGOHR, I.M.; IRIGOYEN, L.F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.L. Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. **Ciência Rural**, v. 33(1), p. 125-131, 2003.
- LIMA, E.F.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R.S.; GOMES, A.B.; LIMA, F.S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25(4), p. 250-264, 2005.
- LOPEZ-DIAZ, T.; FLANNIGAN, B. Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 129-136, 1997.
- LORETTI, A.P.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D. CORRÊA, A.; BANGEL JÚNIOR, J.J.; FERREIRO, L. Neurological disorder in dairy cattle associated with consumption of beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 123-132, 2003.
- MCKENZIE, R.A.; KELLY, M.A.; SHIVAS, R.G.; GIBSON, J.A.; COOK, P.J.; WIDDERICK, K.; GUILFOYLE, A.F. *Aspergillus clavatus* tremorgenic neurotoxicosis in cattle fed sprouted grains. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 10, p. 635-638, 2004.
- MORI, A.E.; LEMOS, R.A.A. Raiva, p. 47-58. In: Lemos, R.A.A. (Ed.) **Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico**. Univesidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 536 p. 1998.

- NOGUEIRA, V.A.; FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P.V. Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29 (3), p. 191-197, 2009.
- OKWEE-ACAI, J.; ACON, J. Claw lesions and lameness in zero-grazed cattle fed on brewer's grain in Uganda. **The Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v.53, p. 107-112, 2005.
- OLIVEIRA, M.A.B. **Cerveja: Análise Sensorial e Fabricação** Ed. Noryam, 90p. Cachoeiro de Itapemirim, 2009.
- PEIXOTO P.V., BRUST L.A.C., BRITO M.F., FRANÇA T.N., MALAFAIA P. & TOKARNIA C.H. Ethanol poisoning in cattle by ingestion of waste beer yeast in Brazil, p.494-498. In: Riet-Correa F., Pfister J., Schild A.L. & Wierenga T.L. (Eds.), **Poisoning by Plants, Mycotoxins, and Related Toxins**. CABI, London, 2011.
- PENN, J.; PURCELL, M.; MANTLE, P.G. Biosynthesis of gyantrypine by *Aspergillus clavatus*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, n. 92, p. 229 – 234, 1992.
- PROPHET E.B., MILLS B.,ARRINGTON J.B., LESLIE H. & SOBIN L.H.M.D. In **Laboratory Methods in Histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC.280p., 1992.
- QIAO, K.; CHOOI, Y.H.; TANG, Y. Identification and engineering of the cytochalasin gene cluster from *Aspergillus clavatus* NRRL 1. **Metab.Eng.**, v.13, p. 723-732, 2011.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C; HINCHCLIFF, K.W. **ClínicaVeterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9ª Ed. Rio de Janeiro: G. Koogan, p. 235-310, 2002.

- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.; BORGES, J.R. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**, v. 2. 3<sup>a</sup> Ed. Pallotti, Santa Maria, 694p. 2007.
- ROLLINSON, J.; TAYLOR, F.G.R.; CHESNEY, J.N. Salinomycin poisoning in horses. **Vet. Rec.**, v. 121, p. 126-128, 1987.
- SABATER-VILAR, M.; MAAS, R.F.M.; DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; FINK-GREMMELS, J. Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle. **Mycopathologia**, n. 158, p. 419-426, 2004.
- SANTOS, M.S.; RIBEIRO, F.M. **Cervejas e Refrigerantes**. São Paulo: CETESB, 58p. 2005.
- SCHWEITZER, D.; KIMBERLING, G.; SPRAKER, T.; STEMER, E.E. Accidental monensin sodium intoxication of feedlot cattle. **J. Am.Vet. Med. Assoc.**, v. 184 (10), p. 1273-1276, 1984.
- SLYTER, L.L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**, v. 43(4), p. 910-929, 1976.
- STÖBER, M. Differential symptomatologieeiniger Krankheiten des zentralen Nervensystems des Rindes. **Vet Med. Nachr**, v. 2(1), p. 99-121, 1984.
- STÖBER M. Botulismo, p.1007-1011. In: Dirksen G., Gründer H.D. & Stöber M. (Eds), **Medicina Interna y Cirugía del Bovino** Vol 2. 4<sup>a</sup> ed. Inter-Médica, Buenos Aires, 2005.
- SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**. St. Louis: Mosby, 526p. 1995.
- SUZUKI, T.; TAKEDA, M.; TANABE, H. A new mycotoxin produced by *Aspergillus clavatus*. **Chem. Pharm. Bull** (Tokyo), n. 19, p. 1786-1788, 1971.

- TOKARNIA C.H., BRITO M.F., BARBOSA J.D., PEIXOTO P.V.; DÖBEREINER J.  
In: Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. (Eds),  
**Plantas Tóxicas do Brasil**. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, Parte geral, p.5-26  
2012
- TOKARNIA C.H., PEIXOTO P.V., BARBOSA J.D., BRITO M.F.; DÖBEREINER J.  
Deficiências minerais em animais de produção. Helianthus. Rio de Janeiro. 200p.,  
2010.
- TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H.; CARVALHO,  
E.V. Botulismo em bovinos no Estado do Piauí, Brasil. **Pesquisa Agropecuária  
Brasileira**, Série Vet., v. 5, p. 465-472, 1970.
- UNDERWOOD W.J. Rumen lactic acidosis. I. Epidemiology and pathophysiology.  
**Compend.Contin. Educ. Pract. Vet.** v. 14, p. 1127-1334, 1992a
- UNDERWOOD W.J. Rumen lactic acidosis. II. Clinical signs, diagnosis, treatment, and  
prevention. **Compend.Contin. Educ. Pract. Vet.** v. 14, p. 1265-1270 , 1992b.
- VAN DER LUGT, J.J.; PROZESKY, L.; VAN WILPE, E. Acute *Aspergillus clavatus*  
poisoning in cattle: light microscopical and ultrastructural lesions in spinal cord.  
In: VAN DER LUGT, J.J (Ed) **The Clinicopathology and Pathology of Selective  
Toxicoses and Storage Diseases of the Nervous System of Ruminants in  
Southern Africa**. Doctoral Tesis. University of Utrecht, Netherlands, 2002.
- VAN DER LUGT, J.J.; KELLERMAN, T.S.; VAN VOLLENHOVEN, A.; NEL, P.W.  
Spinal cord degeneration in adult dairy cows associated with the feeding of  
sorghum beer residues. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.  
65, n. 4, p. 184-188, 1994.
- VAN VLEET, J.F.; AMSTUTZ, H.E.; WEIRICH, W.E.; REBAR, A.H.; FERRANS,  
V.J. Clinical, clinic-pathological alterations in acute monensin toxicosis in cattle.  
**Am. J. Vet. Res.**, v. 44 (11), p. 2133-2144, 1983.

- VAN VLEET, J.F.; VALENTINE, B. Muscle and Tendon, Cap 2. In: **Pathology of Domestic Animals**. Jubb, Kennedy and Palmer's. 5<sup>a</sup> Ed. Elsevier Saunders, p. 185-280, 2007.
- VARGA, J.; SAMSON, R.A. Ribotoxin genes in isolates of *Aspergillus* section *Clavati*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 3, p. 481-485, 2008.
- VARGA, J.; DUE, M.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 89-106, 2007.
- VARGA, J.; RIGÓ, K.; MOLNÁR, J.; TÓTH, B.; SZENCZ, S.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Mycotoxin production and evolutionary relationships among species of *Aspergillus* section *Clavati*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 83, n. 2, p. 191-200, 2003.
- WANG, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, W. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **Federation of European Microbiological Societies, Immunol.Med. Microbiology**, v. 34, p. 51-57, 2002.
- WESTENDORF M.L. & WOHLT J.E. Brewing by-products: their use as animal feeds. **Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.**, v. 18, p. 233-252, 2002.
- WOUTERS, A.T.B.; WOUTERS, F.; BARROS, C.S.L. Intoxicação experimental por narasina em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17 (2), p. 82-95, 1997a.
- WOUTERS, A.T.B.; WOUTERS, F.; BARROS, C.S.L. Intoxicação experimental por narasina em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17 (3), p. 89-95, 1997b.

## Anexo 1

Enfermidade	Aspectos clínico-epidemiológicos	Lesões macroscópicas	Alterações histológicas
Síndromes tremorgênicas causadas por plantas tóxicas ( <i>Ipomoea asarifolia</i> e outras) e por fungos ( <i>Claviceps paspali</i> , <i>Stenocarpella maydis</i> e outros).	<i>Presença e histórico de ingestão da planta.</i> Balanço da cabeça, tremores musculares, desequilíbrio do posterior e queda do animal.	Não são descritas.	<i>Não são descritas.</i>
Intoxicação por plantas que causam doenças do armazenamento lisossomal ( <i>Sida carpinifolia</i> , <i>Solanum fastigiatum</i> I. <i>carnea</i> , subsp. <i>fistulosa</i> , <i>Turbina cordata</i> e outras)	<i>Presença e histórico de ingestão da planta.</i> Alterações da marcha, <i>ataques epiletiformes.</i>	Não são descritas.	Vacuolização citoplasmática de diversos tecidos <i>incluindo neurônios do córtex cerebelar e cerebral,</i> tálamo mesencéfalo e medula espinhal.
Encefalite espongiforme bovina (EEB)	<i>Histórico de ingestão de proteína de origem animal.</i> Embora não exista predileção por raça ou sexo, por questões de manejo a doença ocorre principalmente em vacas de leite, entre 3 e 6 anos de idade. Nervosismo, reação exagerada a estímulos externos e dificuldade de locomoção, principalmente nos membros pélvicos.	Não são descritas.	Lesões degenerativas simétricas, bilaterais com vacuolização neuronal (neuropila da substância cinzenta e no pericário), distribuídas regularmente no núcleo do trato solitário, trato espinhal do nervo trigêmeo, núcleo vestibular, formação reticular do bulbo, substância cinzenta do mesencéfalo, área paraventricular do tálamo e no septo talâmico.
Botulismo	<i>Histórico ou observação de ingestão de ossos,</i> sintomas neuromusculares, paralisia dos músculos da mastigação e deglutição, <i>sensorio permanece inalterado até próximo da morte</i>	Não são descritas	<i>Não são descritas.</i>
Raiva	Alterações neurológicas com desfecho letal após uma evolução variável entre 2 e 10 dias	Não são descritas	<i>Encefalite não-purulenta e presença de corpúsculos de Negri.</i>
Leucose com envolvimento medular	A forma multicêntrica do adulto é enzoótica, acomete animais com mais de 2 anos de idade (maior incidência 5 a 7 anos). Incoordenação, paresia e paralisia dos membros pélvicos.	<i>Compressão da medula espinhal por massas neoplásicas localizadas na região epidural.</i>	<i>Proliferação de células da série linfocítica e infiltração maciça destas células nos órgãos afetados.</i>
Intoxicações crônicas por organofosforados e carbamatos	<i>Histórico de exposição ao agente.</i> Dificuldade locomotora, principalmente, dos membros pélvicos e ataxia que progride para paraplegia.	Não são descritas	Edema axonal, cromatólise e necrose de neurônios do tronco encefálico com esferoides axonais na substância cinzenta.
Intoxicações por “levedo” de cerveja/etanol	Histórico de ingestão de subprodutos de cervejaria. Embriaguez, incoordenação motora severa e acompanhada por movimentos espásticos.	Odor etílico no conteúdo ruminal.	<i>Não são descritas.</i>
Miopatias nutricionais	<i>Afeta animais jovens, de crescimento rápido (bezerros de 2 a 4 meses) sob regime alimentar (pastagem/ração) deficiente em selênio e vitamina E.</i>	Áreas com estrias ou manchas de coloração branco-acinzentada até amarelada, de consistência mais firme na musculatura esquelética e no músculo cardíaco.	<i>Não são descritas lesões no SNC e na medula espinhal.</i> Degeneração e necrose coagulativa, com fragmentação das fibras musculares e calcificação distrófica.
Miopatias tóxicas	<i>Histórico de ingestão de antibióticos ionóforos/Presença e histórico de ingestão de sementes de Senna occidentalis e S. obtusifolia.</i>	Áreas pálidas em músculos esqueléticos e miocárdio.	<i>Não são descritas lesões no SNC e na medula espinhal.</i> Degeneração e necrose de miofibras.

## ANEXO 2

### Protocolo de Exame Clínico Neurológico

Data: **01/12/2011**

Propriedade: D

Município: PATY DO ALFERES

Identificação do animal: nome: \_\_\_ Sobrevivente \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Tempo de evolução: \_\_\_\_\_ - Início / Curso:

\_\_\_\_\_

Exame físico: Estado de nutrição: \_\_\_ REGULAR \_\_\_\_\_ Atitude: \_ATIVO \_\_\_\_\_

Temperatura: \_\_\_\_\_ °C FR: \_\_\_\_\_ mp FC: \_\_\_\_\_ bpm MR:-

\_\_\_\_\_ Desidratação: \_\_\_\_\_ %

Mucosas: **NORMAL** \_\_\_\_\_ -Linfonodos aparentes: \_\_\_\_\_

#### EXAME NEUROLÓGICO

##### CABEÇA:

NÍVEL DE CONSCIÊNCIA:  **Atento/Alerta** ( ) Delírios ( ) Apático/Deprimido ( ) Semicomatoso/Estupor

( ) Comatoso ( ) Hiperexcitabilidade

COMPORTAMENTO: **S/A** ( ) Mugidos ( ) Bocejos ( ) Lamber ( ) Manias ( ) Convulsões ( ) Agressividade ( ) Pressionar a cabeça ( ) Curso errante ( ) Andar compulsivo ( ) Balançar a cabeça ( ) Andar em círculo

POSTURA: ( ) Desvio lateral da cabeça ( ) Giro ortotônico da cabeça e pescoço ( ) Tremores ( ) Balançar da cabeça ( ) Opistótono ( ) Pleurotônico

Outras observações: **não apresentava mais tremores**

---

**Pescoço, tronco e membros:**

**N = Normal; A = Ausente; P = Presente; D = Diminuído; AA = Aumentado**

Massa muscular ( **N** ) Sudorese ( **A** ) Reflexo cervico-facial ( - ) Reflexo músculo-cutâneo ( **N** )

Observações:

<b>Membros Anteriores</b>		Esquerdo	Direito
<b>Cascos (desgastes)</b>		<b>s/a</b>	<b>s/a</b>
Propriocepção		<b>s/a</b>	<b>s/a</b>
Tônus		<b>s/a</b>	<b>s/a</b>
Sensibilidade	superficial	<b>Pouco reduzido</b>	<b>Pouco reduzido</b>
	profunda	<b>s/a</b>	<b>s/a</b>
Reflexo biceptal		-	-
Reflexo triceptal		-	-
Reflexo carpo-radial		-	-
Reflexo flexor		-	-
<b>Membros Posteriores</b>		Esquerdo	Direito
<b>Cascos (desgastes)</b>		<b>s/a</b>	<b>s/a</b>
Propriocepção		<b>s/a</b>	<b>s/a</b>
Tônus		<b>s/a</b>	<b>s/a</b>
Sensibilidade	superficial	<b>Pouco reduzido</b>	<b>Pouco reduzido</b>
	profunda	<b>s/a</b>	<b>s/a</b>
Reflexo patelar		-	-
Reflexo tibial cranial		-	-

Observações:

---



---



---



---



---

**Cauda e Ânus:**

<b>N = Normal; A = Ausente; P = Presente; D = Diminuído; AA = Aumentado</b>		
	Cauda	Ânus
Atrofia	<b>A</b>	<b>A</b>

Reflexo gastrocnêmio	-	-
Reflexo ciático	-	-
Reflexo flexor	-	-

**Andar:**

**( A ) Ausente                      ( P ) Presente**

OBS: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**0** = padrão normal de locomoção;  
**1** = déficits dificilmente observados durante a locomoção em linha reta, mas confirmados após a realização de manobras especiais;  
**2** = déficits facilmente observados durante a locomoção em linha reta e exarcebados durante a realização de manobras especiais  
**3** = o animal pode cair quando manobras especiais são realizadas e geralmente apresentam posturas anormais mesmo quando parado;  
**4** = quedas espontâneas durante a locomoção;  
**5** = decúbito permanente

	Esquerdo		Direito	
	Anterior	Posterior	Anterior	Posterior
Ataxia	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
Grau				
	Esquerdo		Direito	

	Anterior	Posterior	Anterior	Posterior
Paresia	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
Hipermetria	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
Hipometria	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
Espasticidade	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
Flacidez	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>

**Nervos cranianos:**

**N = Normal; A = Ausente; P = Presente; D = Diminuído; AA = Aumentado**

Pares de Nervos		Direito	Esquerdo	
I – Olfatório		-	-	
II – Óptico (Visão)		<b>N</b>	<b>N</b>	
III – Oculomotor	Reflexo pupilar – direto (II, III)	-	-	
	Reflexo pupilar – consensual (II, III)	-	-	
	Reflexo pupilar – esquerdo (II, III)	-	-	
	Reflexo pupilar – consensual (II, III)	-	-	
	Estrabismo lateral	-	-	
IV – Troclear	Estrabismo dorso medial	<b>A</b>	<b>A</b>	
V – Trigêmio	Sens.	Reflexo palpebral	<b>N</b>	<b>N</b>
		Sensibilidade da face	<b>N</b>	<b>N</b>
	Mot.	Mastigação	-	-
		Massa muscular	-	-
VI – Abducente	Estrabismo medial	<b>A</b>	<b>A</b>	
VII – Facial (Motor)	Ptose auricular	<b>A</b>	<b>A</b>	
	Ptose palpebral	<b>A</b>	<b>A</b>	

	Ptose labial	<b>A</b>	<b>A</b>	
VIII – Vestibulococlear (Sistema Vestibular)	Audição	<b>N</b>	<b>N</b>	
	Desvio de cabeça	<b>A</b>	<b>A</b>	
	Estrabismo ventro-lateral	<b>A</b>	<b>A</b>	
	Nistagmo	Fisiológico	<b>A</b>	<b>A</b>
		Horizontal	<b>A</b>	<b>A</b>
		Vertical	<b>A</b>	<b>A</b>
		Rotacional	<b>A</b>	<b>A</b>
Posicional		<b>A</b>	<b>A</b>	
Fase rápida	<b>A</b>	<b>A</b>		
IX – Glossofaríngeo (Motor)	Deglutição	<b>N</b>	<b>N</b>	
X – Vago	Deglutição	<b>N</b>	<b>N</b>	
	“Slap Test”			
XI – Acessório	Atrofia esternocéfálico	<b>A</b>	<b>A</b>	
	trapézio	<b>A</b>	<b>A</b>	
	braquiocefálico	<b>A</b>	<b>A</b>	
	omotransverso	<b>A</b>	<b>A</b>	
XII – Hipoglosso	Protrusão / Desvio de língua	<b>A</b>	<b>A</b>	
	atrofia	<b>A</b>	<b>A</b>	
	Apreensão de alimento e água	<b>N</b>	<b>N</b>	
		<b>Direito</b>	<b>Esquerdo</b>	
Síndrome de Horner (SNA – simpático)	Miose	<b>A</b>	<b>A</b>	
	Enoftalmia	<b>A</b>	<b>A</b>	
	Prolapso de 3º- pálpebra	<b>A</b>	<b>A</b>	
	Sudorese (face, pescoço)	<b>A</b>	<b>A</b>	

OBS:

**ANEXO 3**

Credenciamento Junto ao MAPA: Rede MAPA		Laboratório da Rede Oficial Recife - PE - LANAGRO/PE R. Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Dois Irmãos, CEP: 5217 Tel (81) 3441.6311 Fax
--	---	---

**LAUDO IMUNO-HISTOQUIMICO DE MATERIAL DO PROGRAMA DXSNC**

Protocolo do Laboratório: 884812	Protocolo do remetente: não informado
----------------------------------	---------------------------------------

Categoria da amostra:  
Encéfalo de bovino com sinais clínicos de distúrbios nervosos e que testou negativo para raiva em Laboratórios da rede oficial

Espécies: Bovina	Raça: SRD	Sexo: F	Idade: 08 anos
------------------	-----------	---------	----------------

Proprietário:	Procedência
Propriedade:	Nº SIF: não se aplica
	UF: RJ
	Município: PATY DO ALFERES

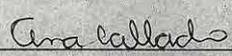
Entrada: 01/10/2012	Encaminhamento: 03/09/2012	Nº de Blocos: 1	Saida: 17/10/2012
---------------------	----------------------------	-----------------	-------------------

Remetente e endereço do órgão requisitante:  
SSA/SFA-RJ  
Av. Rodrigues Alves, 129, 7º andar.  
CEP: 20081-250  
Rio de Janeiro/RJ  
Fone: (21) 2291-4141

Histórico:  
O animal estava com ataxia, incoordenação, tetania, movimento de pedaleio, tremores, tenesmo, alteração comportamental, sialorréia e opistótono, vindo a óbito 2 horas após início sinais clínicos.  
Esta amostra recebeu o registro 116/11 no Centro de Pesquisa Estadual em Sanidade Animal Dr. Geraldo Manhães Carneiro (CEPGM) da PESAGRO-RIO.

Resultado: NEGATIVO

RECIFE-PE, 19/10/2012

Patologista Responsável: 	Data: 19/10/2012
---	---------------------

Anna Regina Cunha Galvão  
Fiscal Federal de Alimentos  
C.F.N. 2572  
Médica Veterinária - CRMV/PE 2534  
MAPA-LAN-CFO/PE

**ANEXO 4**

<b>LQEPV</b> Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária	<i>Seropédica, 14 de julho de 2016</i>		
	Paciente: Cristal Número: 235_16 Espécie: Bovino	Raça: girolando Sexo: fêmea Idade: 36 meses	Proprietário: Veterinário: Glenda Ribeiro CRMV: 5169

<b>Hemograma</b>					
Amostra:	Sangue com EDTA		Método:	Automatizado (pocH 100 IV Diff - Sysmex) e Microscopia Óptica.	
<i>Eritrograma</i>	Resultados		Valores de Referência		
Hemácias (x10 <sup>6</sup> céls/µL)	6,36		5,00	-	10,00
Hemoglobina (g/dL)	9,7		8,0	-	15,0
Hematócrito (%)	29,8		24,0	-	46,0
VCM (fL)	46,9		40,0	-	60,0
HCM (pg)	15,3		11,0	-	17,0
CHCM (g/dL)	32,6		30,0	-	36,0
Metarrubricitos (%)	0				0
<i>Leucograma</i>	%	/µL	%	/µL	
Leucócitos		13.800		4000	- 12000
Mielócitos	0	0	0		0
Metamielócitos	0	0	0		0
Bastões	0	0	0	2	0 - 120
Segmentados	21	2898	15	45	600 - 4000
Linfócitos	60	8280	45	75	2500 - 7500
Monócitos	9	1242	2	7	25 - 850
Eosinófilos	10	1380	0	20	0 - 2400
Basófilos	0	0	0	2	0 - 200
Plaquetas (céls/µL)		330.000		100.000	- 800.000
Proteínas (g/dL)		8,0		6,0	- 8,0
Fibrinogênio (g/dL)		0,8		0,2	- 0,4

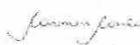
Comentários: Não foram observados hemoparasitas na amostra.

Leucocitose

Linfocitose absoluta

Monocitose

Médicos Veterinários Responsáveis



Carmen Corrêa  
CRMV: 12631



Letícia Zanfagnini  
CRMV: 12641



Tatiane Silva  
CRMV: 12854



Alana Oliveira  
CRMV: 13100



Mariana Revoredo  
CRMV: 13109

<b>LQEPV</b> Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária		Seropédica, 14 de julho de 2016	
Paciente:	Cristal	Raça:	girolando
Número:	235_16	Sexo:	fêmea
Espécie:	Bovino	Idade:	36 meses
		Proprietário:	Glenda Ribeiro
		Veterinário:	5169
		CRMV:	5169

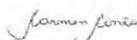
### Bioquímica

Método: Automatizado (BiosystemsA15).

Parâmetros avaliados	Resultados	Valores de Referência	
<b>AST (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	166,0	60,0	- 125,0
<b>Uréia (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	16,0	10,0	- 25,0
<b>Creatinina (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	1,1	0,5	- 2,2
<b>Fosfatase Alcalina (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	87,0	18,0	- 153,0
<b>GGT (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	20,0	6,0	- 17,4
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	0,8	0,00	- 1,60
<b>Bilirrubina direta (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	0,03	-	-
<b>CK (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	829,0	0,0	- 350,0
<b>Lactato Desidrogenase (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	3470,0	309,0	- 938,0
<b>Fósforo (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	5,1	5,6	- 8,0
<b>Cálcio total (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	10,6	8,0	- 11,4

\*Inferior ao limite de detecção

#### Médicos Veterinários Responsáveis



Carmen Corrêa  
CRMV: 12631



Letícia Zanfagnini  
CRMV: 12641



Tatiane Silva  
CRMV: 12654



Alana Oliveira  
CRMV: 13100



Mariana Revoredo  
CRMV: 13109

Valores de referência obtidos do Merck Veterinary Manual - Serum Biochemical Reference Ranges.  
Bilirrubinas KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 2008.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Departamento de Parasitologia Animal - Seropédica - RJ - CEP.: 23890-000 - Tel.: (021)26823051

<b>LQEPV</b> Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária		<i>Seropédica, 14 de julho de 2016</i>	
Paciente: Grauna	Raça: girolando	Proprietário:	
Número: 236_16	Sexo: fêmea	Veterinário: Glenda Ribeiro	
Espécie: Bovino	Idade: 36 meses	CRMV: 5169	

### Hemograma

Amostra: Sangue com EDTA      Método: Automatizado (pocH 100 IV Diff - Sysmex) e Microscopia Óptica.

<i>Eritrograma</i>	Resultados		Valores de Referência	
Hemácias (x10 <sup>6</sup> céls/μL)	4,98		5,00	- 10,00
Hemoglobina (g/dL)	7,1		8,0	- 15,0
Hematócrito (%)	22,7		24,0	- 46,0
VCM (fL)	45,6		40,0	- 60,0
HCM (pg)	14,3		11,0	- 17,0
CHCM (g/dL)	31,3		30,0	- 36,0
Metarrubricitos (%)	0		0	

<i>Leucograma</i>	%	/μL	%	/μL
Leucócitos		14.600		4000 - 12000
Mielócitos	0	0	0	0
Metamielócitos	0	0	0	0
Bastões	0	0	0 - 2	0 - 120
Segmentados	40	5840	15 - 45	600 - 4000
Linfócitos	49	7154	45 - 75	2500 - 7500
Monócitos	8	1168	2 - 7	25 - 850
Eosinófilos	3	438	0 - 20	0 - 2400
Basófilos	0	0	0 - 2	0 - 200

Plaquetas (céls/μL)	350.000	100.000 - 800.000
Proteínas (g/dL)	7,4	6,0 - 8,0
Fibrinogênio (g/dL)	0,8	0,2 - 0,4

Comentários: Não foram observados hemoparasitas na amostra.

Anemia Normocítica Normocrômica

Leucocitose

Neutrofilia absoluta

Monocitose

Presença de Anisocitose (+) e Agregado Plaquetária (+).

Médicos Veterinários Responsáveis

  
Carmen Corrêa  
CRMV: 12631

  
Leticia Zanfagnini  
CRMV: 12641

  
Tatiane Silva  
CRMV: 12854

  
Alana Oliveira  
CRMV: 13100

  
Mariana Revoredo  
CRMV: 13109

<b>LQEPV</b>					
Laboratório de Diagnóstico Experimental em Parasitologia Veterinária		Seropédica, 14 de julho de 2016			
Paciente:	Grauna	Raça:	girolando	Proprietário:	
Número:	236_16	Sexo:	fêmea	Veterinário:	Glenda Ribeiro
Espécie:	Bovino	Idade:	36 meses	CRMV:	5169

### Bioquímica

Método: Automatizado (BiosystemsA15).

Parâmetros avaliados	Resultados	Valores de Referência
<b>AST (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	62,0	60,0 - 125,0
<b>Uréia (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	16,0	10,0 - 25,0
<b>Creatinina (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	0,9	0,5 - 2,2
<b>Fosfatase Alcalina (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	94,0	18,0 - 153,0
<b>GGT (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	26,0	6,0 - 17,4
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	0,5	0,00 - 1,60
<b>Bilirrubina direta (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	-	-
<b>CK (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	95,0	0,0 - 350,0
<b>Lactato Desidrogenase (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	2835,0	309,0 - 938,0
<b>Fósforo (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	4,9	5,6 - 8,0
<b>Cálcio total (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	10,6	8,0 - 11,4

\*Inferior ao limite de detecção.

#### Médicos Veterinários Responsáveis

  
Carmen Corrêa  
CRMV: 12631

  
Letícia Zanfagnini  
CRMV: 12641

  
Tatiane Silva  
CRMV: 12854

  
Alena Oliveira  
CRMV: 13100

  
Mariana Revoredo  
CRMV: 13109

Valores de referência obtidos do *Merck Veterinary Manual - Serum Biochemical Reference Ranges*  
Bilirrubinas KANEKO, J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 2008.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Departamento de Parasitologia Animal - Seropédica - RJ - CEP.: 23850-000 - Tel. (021)26823051

<b>LQEPV</b> Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária	<i>Seropédica, 14 de julho de 2016</i>		
	Paciente: Marieta Número: 237_16 Espécie: Bovino	Raça: girolando Sexo: fêmea Idade: 36 meses	Proprietário: Veterinário: Glenda Ribeiro CRMV: 5169

**Hemograma**

Amostra: Sangue com EDTA      Método: Automatizado (poch 100 IV Diff - Sysmex) e Microscopia Óptica.

<i>Eritrograma</i>	Resultados	Valores de Referência	
Hemácias (x10 <sup>6</sup> céls/μL)	6,40	5,00	- 10,00
Hemoglobina (g/dL)	10,1	8,0	- 15,0
Hematócrito (%)	34,0	24,0	- 46,0
VCM (fL)	53,1	40,0	- 60,0
HCM (pg)	15,8	11,0	- 17,0
CHCM (g/dL)	29,7	30,0	- 36,0
Metarrubricitos (%)	0	0	

<i>Leucograma</i>	%	/μL	%	/μL
Leucócitos		12.700		4000 - 12000
Mielócitos	0	0	0	0
Metamielócitos	0	0	0	0
Bastões	0	0	0 - 2	0 - 120
Segmentados	30	3810	15 - 45	600 - 4000
Linfócitos	54	6858	45 - 75	2500 - 7500
Monócitos	3	381	2 - 7	25 - 850
Eosinófilos	3	381	0 - 20	0 - 2400
Basófilos	0	0	0 - 2	0 - 200

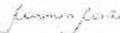
  

Plaquetas (céls/μL)	192.000	100.000	- 800.000
Proteínas (g/dL)	6,8	6,0	- 8,0
Fibrinogênio (g/dL)	0,8	0,2	- 0,4

Comentários: Não foram observados hemoparasitas na amostra.

Leucocitose

Médicos Veterinários Responsáveis

  
Carmen Corrêa  
CRMV: 12631

  
Letícia Zanfagnini  
CRMV: 12641

  
Tatiane Silva  
CRMV: 12854

  
Alana Oliveira  
CRMV: 13100

  
Mariana Revoredo  
CRMV: 13109

<b>LQEPV</b>					
Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária		Seropédica, 14 de julho de 2016			
Paciente:	Marieta	Raça:	girolando	Proprietário:	
Número:	237_16	Sexo:	fêmea	Veterinário:	Glenda Ribeiro
Espécie:	Bovino	Idade:	36 meses	CRMV:	5169

### Bioquímica

Método: Automatizado (BiosystemsA15).

Parâmetros avaliados	Resultados	Valores de Referência
<b>AST (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	73,0	60,0 - 125,0
<b>Uréia (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	8,0	10,0 - 25,0
<b>Creatinina (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	1,1	0,5 - 2,2
<b>Fosfatase Alcalina (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	108,0	18,0 - 153,0
<b>GGT (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	12,0	6,0 - 17,4
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	0,5	0,00 - 1,60
<b>Bilirrubina direta (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	*	-
<b>CK (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	129,0	0,0 - 350,0
<b>Lactato Desidrogenase (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	2830,0	309,0 - 938,0
<b>Fósforo (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	6,0	5,6 - 8,0
<b>Cálcio total (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	10,4	8,0 - 11,4

\*Inferior ao limite de detecção

#### Médicos Veterinários Responsáveis



Carmen Corrêa  
CRMV: 12631



Letícia Zanfagnini  
CRMV: 12641



Tatiane Silva  
CRMV: 12854



Alana Oliveira  
CRMV: 13100



Mariana Revoredo  
CRMV: 13109

Valores de referência obtidos do *Merck Veterinary Manual - Serum Biochemical Reference Ranges*.  
Bilirrubinas KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 2008.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Departamento de Parasitologia Animal - Seropédica - RJ - CEP.: 23860-000 - Tel.: (021)26823051

<b>LQEPV</b> Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária		Seropédica, 14 de julho de 2016	
Paciente:	Mel (030)	Raça:	girolando
Número:	234_16	Sexo:	fêmea
Espécie:	Bovino	Idade:	36 meses
		Proprietário:	
		Veterinário:	Glenda Ribeiro
		CRMV:	5169

### Hemograma

Amostra: Sangue com EDTA      Método: Automatizado (pocH 100 IV Diff - Sysmex) e Microscopia Óptica.

Eritrograma	Resultados	Valores de Referência	
Hemácias (x10 <sup>6</sup> céls/μL)	7,34	5,00	- 10,00
Hemoglobina (g/dL)	9,5	8,0	- 15,0
Hematócrito (%)	29,2	24,0	- 46,0
VCM (fL)	39,8	40,0	- 60,0
HCM (pg)	12,9	11,0	- 17,0
CHCM (g/dL)	32,5	30,0	- 36,0
Metarrubricitos (%)	0		0

Leucograma	%	/μL	%	/μL
Leucócitos		12.100		4000 - 12000
Mielócitos	0	0	0	0
Metamielócitos	0	0	0	0
Bastões	0	0	0 - 2	0 - 120
Segmentados	18	2178	15 - 45	600 - 4000
Linfócitos	76	9196	45 - 75	2500 - 7500
Monócitos	3	363	2 - 7	25 - 850
Eosinófilos	3	363	0 - 20	0 - 2400
Basófilos	0	0	0 - 2	0 - 200

Plaquetas (céls/μL)	461.000	100.000	- 800.000
Proteínas (g/dL)	7,8	6,0	- 8,0
Fibrinogênio (g/dL)	0,8	0,2	- 0,4

Comentários: Não foram observados hemoparasitas na amostra.

Leucocitose

Linfocitose

Médicos Veterinários Responsáveis

  
Carmen Corrêa  
CRMV: 12631

  
Letícia Zanfagnini  
CRMV: 12641

  
Tatiane Silva  
CRMV: 12854

  
Alana Oliveira  
CRMV: 13100

  
Mariana Revoredo  
CRMV: 13109

<b>LQEPV</b> Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária		Seropédica, 14 de julho de 2016	
Paciente:	Mel (030)	Raça:	girolando
Número:	234_16	Sexo:	fêmea
Espécie:	Bovino	Idade:	36 meses
		Proprietário:	Glenda Ribeiro
		Veterinário:	5169
		CRMV:	5169

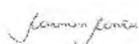
### Bioquímica

Método: Automatizado (BiosystemsA15).

Parâmetros avaliados	Resultados	Valores de Referência
<b>AST (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	84,0	60,0 - 125,0
<b>Uréia (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	16,0	10,0 - 25,0
<b>Creatinina (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	1,0	0,5 - 2,2
<b>Fosfatase Alcalina (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	92,0	18,0 - 153,0
<b>GGT (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	19,0	6,0 - 17,4
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	0,4	0,00 - 1,60
<b>Bilirrubina direta (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	*	-
<b>CK (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	312,0	0,0 - 350,0
<b>Lactato Desidrogenase (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	2590,0	309,0 - 938,0
<b>Fósforo (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	3,5	5,6 - 8,0
<b>Cálcio total (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	9,9	8,0 - 11,4

\* Inferior ao limite de de detecção.

#### Médicos Veterinários Responsáveis



Carmen Corrêa  
CRMV: 12631



Letícia Zanfagnini  
CRMV:12641



Tatiane Silva  
CRMV:12854



Alana Oliveira  
CRMV: 13100



Mariana Revoredo  
CRMV: 13109

Valores de referência obtidos do Merck Veterinary Manual - Serum Biochemical Reference Ranges.  
Bilirrubinas KANEKO,J.J.;HARVEY,J.W.;BRUSS,M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 2008.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Departamento de Parasitologia Animal - Seropédica - RJ - CEP.: 23890-000- Tel.:(021)26823051

## ANEXO 5

<b>LQEPV</b>					
Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária		Seropédica, 01 de agosto de 2016			
Paciente:	Sem nome	Espécie:	Ovino	Veterinário:	Glenda
Número:	256_16	Raça:	Santa Inês	CRMV:	
		Sexo:	Macho	Propriet	Glenda
		Idade:	5 meses		

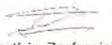
### Bioquímica

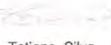
Método: Automatizado (BiosystemsA15).

Parâmetros avaliados	Resultados	Valores de Referência
<b>AST (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	197,0	49,0 - 123,0
<b>Uréia (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	29,0	10,0 - 26,0
<b>Creatinina (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	1,2	0,9 - 2,0
<b>Fosfatase Alcalina (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	217,0	27,0 - 156,0
<b>GGT (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	31,0	20,0 - 44,0
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	0,1	0,00 - 0,50
<b>Bilirrubina direta (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	0,01	-
<b>CK (U/L)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	485,0	7,1 - 101,0
<b>Lactato Desidrogenase (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	1123,0	83,0 - 476,0
<b>Fósforo (mg/dL)</b> <i>Cinético UV automatizado</i>	9,1	4,0 - 7,3
<b>Cálcio total (mg/dL)</b> <i>Colorimétrico automatizado</i>	23,9	9,3 - 11,7

#### Médicos Veterinários Responsáveis

  
Carmen Corrêa  
CRMV: 12631

  
Letícia Zanfagnini  
CRMV: 12641

  
Tatiane Silva  
CRMV: 12854

  
Alana Oliveira  
CRMV: 13100

  
Mariana Revoredo  
CRMV: 13109

Valores de referência obtidos do Merck Veterinary Manual - Serum Biochemical Reference Ranges.  
Bilirrubinas KANEKO, J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 2008.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Departamento de Parasitologia Animal - Seropédica - RJ - CEP.: 23890-000 - Tel.: (021)26823051