

RESULTADOS DE PATOLOGIA CLÍNICA E DOSAGENS DE ELEMENTOS MINERAIS EM BOVINOS ACOMETIDOS PELO BOTULISMO EPIZOÓTICO NO ESTADO DE SÃO PAULO¹

Júlio Augusto N. Lisboa², Marcio R.G. Kuchembuck³, Aguemí Kohayagawa³,
Sueli R. M. Bomfim³, Alcimir M. H. Santiago⁴ e Iveraldo S. Dutra⁵

ABSTRACT.- Lisboa J.A.N., Kuchembuck M.R.G., Kohayagawa A., Bomfim S.R.M., Santiago A.M.H. & Dutra I.S. 1996. [**Clinical pathological data and analyses of mineral elements of cattle affected by epizootic botulism in the State of São Paulo.**] Resultados de patologia clínica e dosagens de elementos minerais em bovinos acometidos pelo botulismo epizootico no Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(4):91-97. Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, Londrina, PR 86051-970, Brazil.

In order to study laboratorial aspects of beef cow mortality, a syndrome popularly known as "doença da vaca caída", exams were made of blood, cerebrospinal fluid, serum, bone and liver samples from 32 naturally affected 4 to 9 year old cows, 27 belonging to the Nelore breed and 5 were crossbred Nelore, all originating from farms located in municipalities near Botucatu, State of São Paulo. Laboratory determinations were analysed by descriptive statistics and included hematological values, total plasma protein, plasma fibrinogen, cerebrospinal fluid analysis, and concentration measurements of serum calcium, phosphorus, magnesium, sodium, potassium, chloride, total protein, albumin, globulin, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, gama-glutamyltransferase and creatine kinase activities, included bone ash percentage and concentrations of calcium, phosphorus and magnesium, and also hepatic levels of copper, zinc, iron, manganese and cobalt. In addition, mouse bioassays and complement micro-fixation tests were performed to detect botulinum toxins in liver samples. The results indicated leukocytosis ($13,3 \pm 3,9 \times 10^3/\text{mm}^3$) with neutrophilia ($8,9 \pm 3,2 \times 10^3/\text{mm}^3$), hypocalcemia ($7,8 \pm 1,7 \text{mg/dl}$), hypophosphatemia ($3,6 \pm 1,6 \text{mg/dl}$), hypoalbuminemia ($2,9 \pm 0,9 \text{g/dl}$), increased creatine kinase activity ($691,0 \pm 829,7 \text{UI/l}$), and reduced ash percentage ($60,3 \pm 1,9\%$) and low phosphorus ($17,2 \pm 0,4\%$) in bone. The other values were all within normal limits. The diagnosis of botulism, involving type C and D toxins, was confirmed as the cause of the mortality in the region of study, what is strongly consistent with the other laboratorial findings.

INDEX TERMS: Bovine, epizootic botulism, hematology, serum biochemistry, mineral deficiency.

¹ Aceito para publicação em 26 de junho de 1996.

Projeto financiado pela FAPESP (92/0970-1).

² Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, Londrina, PR 86051-970.

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

⁴ Laboratório de Doenças Carenciais e Metabólicas, Instituto Biológico, R. Conselheiro Rodrigues Alves 1252, São Paulo, SP 04014-002.

⁵ Departamento de Medicina Veterinária, FOA, Unesp, Campus de Araçatuba, Caixa Postal 533, Araçatuba, SP 16015-050.

SINOPSE.- Com o objetivo de verificar alguns aspectos laboratoriais da mortalidade de vacas de corte, popularmente conhecida como "doença da vaca caída", estudaram-se amostras de sangue total, líquido, soro sanguíneo, osso e fígado colhidas de 32 fêmeas bovinas (27 da raça Nelore e 5 mestiças), entre 4 e 9 anos de idade, naturalmente acometidas e pertencentes a propriedades rurais localizadas em municípios próximos a Botucatu, Estado de São Paulo. Procederam-se as determinações e o estudo estatístico descritivo das variáveis: 1) hematológicas, de

proteínas plasmáticas totais e fibrinogênio; 2) dos aspectos físicos, bioquímicos e celularidade no líquor; 3) de cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio; cloretos, proteína total, albumina, globulina e atividades da fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, gama-glutamilttransferase e creatina quinase no soro sanguíneo; 4) de cinzas, cálcio, fósforo e magnésio no osso, e, 5) de cobre, zinco, ferro, manganês e cobalto no fígado, empregando-se as provas de inoculação em camundongos e de microfixação de complemento para a detecção da presença de toxinas botulínicas nas amostras de tecido hepático. Os resultados apontaram como alterações, leucocitose ($13,3 \pm 3,9 \times 10^3/\text{mm}^3$) com neutrofilia ($8,9 \pm 3,2 \times 10^3/\text{mm}^3$), hipocalcemia ($7,8 \pm 1,7\text{mg/dl}$), hipofosfatemia ($3,6 \pm 1,6\text{mg/dl}$), hipoalbuminemia ($2,9 \pm 0,9\text{g/dl}$), elevação na atividade da creatina quinase ($692,0 \pm 829,7 \text{ UI/l}$) e reduções na cinza ($60,3 \pm 1,9\%$) e fósforo ($17,2 \pm 0,4\%$) ósseos, como indicativos do estado carencial de fósforo, apresentando-se as demais variáveis dentro dos limites de variação considerados normais para a espécie. O diagnóstico de botulismo, com envolvimento das toxinas C e D, foi confirmado como a causa da mortalidade investigada na área de abrangência do estudo, e encontra coerência com o conjunto de resultados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bovino, botulismo epizoótico, hematologia, bioquímica sérica, deficiência mineral.

INTRODUÇÃO

A mortalidade de vacas em rebanhos de corte, de crescente importância nos últimos anos e conhecida na Região Centro-Oeste como "doença da vaca caída", apresenta um comportamento epidemiológico definido, acometendo principalmente animais prenhes ou lactantes de rebanhos criados extensivamente em regiões de cerrado, com falhas na suplementação mineral. O quadro clínico caracteriza-se por decúbito permanente em função de flacidez muscular com evolução para a morte em poucos dias, e o diagnóstico de botulismo foi estabelecido para esta doença (Döbereiner et al. 1990, 1992, Dutra et al. 1993). O botulismo epizoótico dos bovinos fora diagnosticado anteriormente no Piauí (Tokarnia et al. 1970b) e associado à deficiência prévia de fósforo nos rebanhos acometidos.

Em vista da importância econômica do botulismo, utilizando-se material colhido de vacas da raça Nelore e suas mestiças naturalmente acometidas e pertencentes a rebanhos explorados no Estado de São Paulo, o presente trabalho tem como objetivo a realização do estudo de algumas variáveis hematológicas, liquóricas e bioquímicas séricas, assim como, a verificação da existência de deficiência de macro e microelementos minerais com determinação das suas concentrações nos tecidos ósseo e hepático.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Selecionaram-se para o estudo 32 fêmeas bovinas (27 da raça Nelore e 5 mestiças) com idades variando entre 4 e 9 anos,

possuindo história e quadro clínicos, individual e de rebanho, compatíveis com o problema em questão e pertencentes a 27 propriedades rurais, localizadas em municípios relativamente próximos a Botucatu, Estado de São Paulo.

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

Colheita de material

Sangue. O sangue foi colhido mediante punção da veia jugular externa com agulhas metálicas previamente esterilizadas, em frascos contendo anticoagulante EDTA para realização do hemograma, e em tubos de ensaio para a posterior obtenção do soro após a retração do coágulo e centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos, totalizando 26 amostras, processadas em laboratório o mais rapidamente possível no caso do sangue total. O soro sanguíneo foi conservado, quando necessário, por congelamento, cuidando-se para não exceder o período de 30 dias até a realização das análises laboratoriais.

Líquido cefalorraquidiano. Efetuou-se a colheita do material mediante punção no espaço atlanto-occipital com agulhas apropriadas providas de mandril, 100x9, previamente esterilizadas, perfazendo um total de 22 amostras, processadas em laboratório com a maior brevidade possível.

Fígado. O total de 28 amostras de aproximadamente 100g de tecido hepático foi colhido durante o exame necroscópico dos animais, utilizando-se facas limpas de aço inoxidável, e conservando-se por congelamento em sacos plásticos individualmente identificados.

Osso. Um fragmento de aproximadamente 10 cm foi obtido por serragem manual da 12ª costela direita durante a realização da necropsia, sendo acondicionado em saco plástico individual e identificado, e conservado à temperatura de congelamento, totalizando 26 amostras.

Exames laboratoriais

Hemograma. As análises laboratoriais foram realizadas conforme preconizado na literatura (Jain 1986), empregando-se as seguintes metodologias:

- Contagem Global de Hemácias e Leucócitos pelo método de contagem eletrônica de células⁶;
- Hemoglobina pelo método da cianometemoglobina⁷;
- Volume Global pelo método do microhematócrito⁸;
- Volume Globular Médio e Concentração de Hemoglobina Globular Média efetuando-se os cálculos apropriados;
- Contagem Diferencial de Leucócitos através da leitura ao microscópio óptico de esfregaços corados com o corante de Leishman;
- Proteína Total e Fibrinogênio Plasmáticos por refratometria⁹;

Exame do líquor. O processamento e interpretação seguiram as recomendações de Coles (1986) incluindo-se as seguintes análises:

- Exame físico: compreendendo avaliação da cor, do aspecto ou turbidez, e da densidade específica por refratometria¹⁰;

⁶ Contador Automático de Células Sanguíneas CC510 - CELM.

⁷ Hemoglobinômetro L Hemometer L Jungberg.

⁸ Centrifugador de Microhematócrito 207N - FANEM.

⁹ Refratômetro ATAGO CO.

¹⁰ Refratômetro para densidade urinária ATAGO CO.

b) Citologia: contagem global de hemácias, leucócitos e células endométriais realizada em câmara de Fuchs-Rosenthal, e contagem diferencial de leucócitos através da leitura de esfregaços corados com o corante de Leishman ao microscópio óptico, após centrifugação do líquor a 1500 rpm durante 10 minutos;

c) Exame bioquímico: determinação do pH utilizando tira reagente, da proteína total por modificação do método do tricloroacético 5%, e do teste de Pandy.

Bioquímica sérica. As amostras de soro sanguíneo sofreram processamento para a determinação das variáveis discriminadas abaixo utilizando-se, para cada finalidade, kits comerciais específicos¹¹, com exceção das dosagens de sódio e potássio:

a) Cálcio (Ca) por reação com cresolftaleína complexona e leitura colorimétrica¹²;

b) Fósforo (P) por reação com molibdato de sódio e leitura colorimétrica¹²;

c) Magnésio (Mg) pelo método colorimétrico¹²;

d) Sódio (Na) e potássio (K) por fotometria de chama¹³;

e) Cloretos (Cl) por reação com tiocianato de mercúrio e leitura colorimétrica¹²;

f) Proteína Total (PT) pela reação do biureto e leitura colorimétrica¹²;

g) Albumina (Alb) por reação com verde de bromocresol e leitura colorimétrica¹²;

h) Globulina (Glob) efetuando-se a operação de subtração entre os valores de PT e Alb;

i) Fosfatase alcalina (FA), Aspartato aminotransferase (AST), Creatina quinase (CPK) e Gama-glutamilttransferase (GGT) por sistemas enzimáticos específicos e método cinético de leitura¹⁴.

Macroelementos minerais no tecido ósseo. As determinações foram realizadas seguindo a metodologia recomendada por Fick et al. (1979), submetendo as amostras aos processamentos iniciais de remoção de gordura e de calcinação (digestão seca) para obtenção das cinzas, e, a partir das mesmas, verificar as concentrações de Ca e Mg com leitura por espectrofotometria de absorção atômica¹⁵, e de P por colorimetria¹⁶.

Microelementos minerais no tecido hepático. As amostras de fígado sofreram digestão nitro-perclórica (digestão ácida a quente) anteriormente ao processo de diluição para as determinações de cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn) efetuando-se a leitura por espectrofotometria de absorção atômica¹⁵. O processamento para a avaliação dos níveis de cobalto (Co), envolvendo a digestão nitro-perclórica e as extrações sequenciais em clorofórmio com a utilização de beta-nitroso-alfa-naftol, encontra-se descrito por Correa (1957), sendo a leitura realizada por colorimetria¹⁶.

Métodos de diagnóstico para o botulismo. Procederam-se dois métodos distintos para a verificação da presença de toxinas botulínicas nas amostras de fígado colhidas: o teste de inoculação intraperitoneal em camundongos (ensaio biológico) segundo a metodologia clássica e empregada por Tokarnia et al. (1970b), e, o teste de microfixação de complemento segundo a técnica de Weiss & Weiss (1988), utilizando-se as antitoxinas botulínicas C e

D, gentilmente cedidas pelo "Statens Serumstitut" de Copenhagen, Dinamarca. A metodologia laboratorial empregada, envolvendo ambos os exames, desde o preparo inicial das amostras, encontra-se detalhadamente descrita no estudo de Dutra et al. (1993).

Métodos estatísticos

Efetuou-se um estudo estatístico descritivo para o conjunto de variáveis estudadas calculando-se média (x), desvio padrão (s), coeficiente de variação (CV), intervalo de confiança da média (IC) com limites inferior (LI) e superior (LS), e mediana (Md) (Berquó et al. 1980).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme demonstrado no trabalho anterior, o diagnóstico de intoxicação botulínica, com presença das toxinas C e/ou D no tecido hepático, foi confirmado nas vacas estudadas por meio do ensaio biológico em camundongos e do teste de microfixação de complemento, comprovando ser esta a causa da mortalidade investigada na região de

Quadro 1. Apresentação da estatística descritiva para as variáveis hematológicas, incluindo hemácias (He), hemoglobina (Hb), volume globular (VG), volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), leucócitos totais (LT), segmentados (Seg), linfócitos (Linf), eosinófilos (Eos), monócitos (Mono), proteína total (PT) e fibrinogênio (Fib) plasmáticos, observadas em vacas de corte (n=26) naturalmente acometidas pelo botulismo; Estado de São Paulo

Variável	x	s	CV	IC		
				LI	LS	Md
He (x10 ⁶ /mm ³)	7,95	1,12	14,13	7,48	8,41	7,82
Hb (g/dl)	13,26	1,78	13,42	12,52	13,99	13,00
VG (%)	39,56	4,50	11,37	37,70	41,41	39,00
VGM (fl)	50,13	4,58	9,14	48,24	52,02	49,03
CHGM (%)	33,48	2,04	6,11	32,64	34,33	33,57
LT (x10 ³ /mm ³)	13,37	3,96	29,61	11,73	15,00	14,10
Seg (x10 ³ /mm ³)	8,92	3,23	36,26	7,58	10,25	9,10
Linf (x10 ³ /mm ³)	3,74	1,16	31,05	3,26	4,22	3,64
Eos (x10 ³ /mm ³)	0,08	0,15	183,09	0,02	0,14	0,00
Mono (x10 ³ /mm ³)	0,54	0,46	85,04	0,35	0,74	0,42
PT (g/dl)	8,08	0,91	11,28	7,70	8,45	8,00
Fib (mg/dl)	612,00	271,29	44,32	500,01	723,98	600,00

Quadro 2. Apresentação dos resultados obtidos para as variáveis estudadas no líquido cefalorraquidiano das vacas de corte (n=22) naturalmente acometidas pelo botulismo; Estado de São Paulo

Variável	x	s	Md	Característica
Cor				Incolor
Aspecto				Límpido
Densidade	1008,13	1,68	1009,00	
Hemácias (/mm ³)	97,63	120,24	30,00	
Leucócitos (/mm ³)	3,77	4,81	2,00	
Neutrófilos				Ausentes
Linfócitos				Raros
pH	7,79	0,61	8,00	
Proteína Total (mg/dl)	31,91	15,72	27,72	
Teste de Pandy				Negativo

¹¹ Kits Reactoclin - CELM.

¹² Espectrofotômetro SPECTRONIC 88 - BAUSH & LOMB.

¹³ Fotômetro de Chama Digital FC-280 - CELM.

¹⁴ Espectrofotômetro Digital SB 210-P - CELM.

¹⁵ Espectrofotômetro de Absorção Atômica AAS 30 - CARLZEISS/Jena.

¹⁶ Espectrofotômetro Digital B342 - MICRONAL.

abrangência do estudo, o que reforça as citações de Döbereiner et al. (1990, 1992) e Dutra et al. (1993).

Hemograma e exame do líquido

A apreciação do Quadro 1 permite verificar que as vacas acometidas não apresentaram quaisquer alterações com respeito ao eritrograma, proteínas plasmáticas totais e fibrinogênio, observando-se, contudo, ligeira leucocitose com neutrofilia, sendo evidente a inversão entre os valores absolutos de neutrófilos e linfócitos. Tais achados no leucograma poderiam ser interpretados, de acordo com as considerações de Jain (1986), como reflexo de hiperatividade adrenocortical consequente à condição estressante do quadro clínico primário, lembrando-se que nenhum processo patológico ou inflamatório concomitante foi evidenciado durante a realização dos exames clínico e necroscópico nestes animais.

O exame das amostras de líquido cefalorraquidiano (Quadro 2), por sua vez, não revelou apreciáveis alterações segundo as citações de Kaneko (1989) e Mayhew (1989), com exceção do aspecto celularidade pela elevação no número de hemácias presentes, o que provavelmente seja devido à simples contaminação das amostras com sangue no momento da punção para a colheita. Os resultados normais quanto às características físicas e bioquímicas são condizentes com, e reforçam, a observação de que os animais incluídos no estudo não apresentavam qualquer sinal sugestivo de encefalopatia.

Bioquímica sérica

Com relação à bioquímica sérica (Quadro 3), o valor médio obtido para Ca mostrou-se inferior aos apontados pela maioria dos autores consultados (Dayrell et al. 1972, Lopes et al. 1972, 1980a, Fichtner et al. 1976, Kaneko 1989,

Balarin 1990, Kohayagawa et al. 1993), sendo, entretanto semelhante a alguns achados de Tokarnia et al. (1970a) e Pott et al. (1987) em bovinos deficientes em P. A hipocalcemia guarda ainda coerência com as observações de Real (1989) e Real et al. (1991) ao estudarem o problema explorado no presente trabalho, e, não deve ser interpretada como a causa primária do decúbito nos animais, pois os níveis verificados mostram-se superiores àqueles apontados por Kaneko (1989) como críticos para o desenvolvimento do sintoma nos bovinos.

Os resultados para P (Quadro 3) foram inferiores aos citados por Tokarnia et al. (1970a), Dayrell et al. (1972), Lopes et al. (1980a), Kaneko (1989), Balarin (1990) e Kohayagawa et al. (1993), semelhantes a alguns achados de Fichtner et al. (1976) e Pott et al. (1987) em bovinos deficientes, e, superiores somente aos apontados por Lopes et al. (1972) antes de iniciar-se a suplementação mineral. Conforme as indicações de Underwood (1983) e as discussões dos autores supracitados, a hipofosfatemia observada poderia ser interpretada como um indício de que as vacas estudadas apresentassem-se em estado carencial de P, sendo possível admitir inclusive, apoiando-se nas afirmações de Kaneko (1989) e Blood & Radostits (1989), a presença desta condição por um período razoável de tempo, suficiente o bastante para que os mecanismos homeostáticos responsáveis pela manutenção dos níveis séricos tornassem-se relativamente ineficientes. Estas observações contrastam, entretanto, com as referências de Real (1989) e Real et al. (1991), devendo-se salientar que a maioria das suas determinações foi procedida em vacas pertencentes a rebanhos problema, porém não acometidas clinicamente.

Os níveis de Mg (Quadro 3), por sua vez, apresentaram-se inferiores aos encontrados por Lopes et al. (1980a), compatíveis com aqueles citados pela maioria dos autores consultados (Dayrell et al. 1972, Lopes et al. 1972, Pott et al. 1987, Kaneko et al. 1989, Kohayagawa et al. 1993), e superiores aos referidos por Fichtner et al. (1976), o que demonstra a inexistência de desequilíbrio relacionado ao elemento em questão, e está de acordo com as observações de Real (1989) e Real et al. (1991).

De forma semelhante, os animais estudados não demonstraram alterações nos valores de Na e K (Quadro 3), sendo os mesmos concordantes com os apresentados por Fichtner et al. (1976), Almeida et al. (1980), Almeida (1985), Kaneko (1989) e Kohayagawa et al. (1993), o que contrasta com a hipercalemia referida por Real (1989) e Real et al. (1991), respeitando-se a consideração, no relato mais recente, de que os níveis encontravam-se normais ou diminuídos nas vacas com 2 ou 3 dias de decúbito, condição esta que se assemelha à das fêmeas incluídas no presente estudo. Os teores verificados para Cl (Quadro 3) reforçam uma vez mais a evidência da inexistência de alterações séricas destes eletrólitos, pois resultaram normais para a espécie quando comparados às referências de Almeida et al. (1980), Almeida (1985) e Kaneko (1989).

Em relação a PT (Quadro 3), os resultados mostraram-se dentro da faixa de variação normal sugerida por Kaneko

Quadro 3. Estatística descritiva das variáveis séricas cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), sódio (Na), potássio (K), cloretos (Cl), proteína total (PT), albumina (Alb), globulina (Glob), fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CPK) e gama-glutamilttransferase (GGT) encontradas nas vacas de corte (n=26) naturalmente acometidas pelo botulismo; Estado de São Paulo

Variável	x	s	CV	IC		Md
				LI	LS	
Ca (mg/dl)	7,89	1,72	21,86	7,20	8,58	8,10
P (mg/dl)	3,62	1,67	46,30	2,95	4,29	3,30
Mg (mg/dl)	2,59	0,83	32,14	2,25	2,92	2,80
Na (mEq/L)	150,00	5,16	3,44	147,93	152,06	151,50
K (mEq/L)	4,18	0,78	18,75	3,87	4,49	4,05
Cl (mEq/L)	100,03	12,04	12,03	95,21	104,85	95,60
PT (g/dl)	7,31	1,35	18,51	6,76	7,85	7,30
Alb (g/dl)	2,90	0,91	31,37	2,53	3,26	2,75
Glob (g/dl)	4,40	1,12	25,59	3,95	4,85	4,25
FA (UI/L)	107,32	84,22	78,47	73,62	141,02	79,15
AST (UI/L)	144,93	125,28	86,44	94,81	195,05	115,90
CPK (UI/L)	691,05	829,72	120,06	359,10	1023,01	378,54
GGT (UI/L)	13,04	10,55	80,88	8,82	17,26	10,65

(1989) para bovinos, embora ligeiramente mais reduzidos que os apontados por Balarin (1990) e Fagliari et al. (1991), e sensivelmente maiores que os relatados por Nicoletti et al. (1981). O nível sérico de Alb (Quadro 3) mostrou-se, por outro lado, inferior aos referidos por Kaneko (1989), Balarin (1990) e Fagliari et al. (1991) indicando a presença de leve hipoalbuminemia nas vacas acometidas, fato que permite a interpretação de que talvez estes animais estivessem submetidos a uma dieta hipoprotéica, apoiando-se nas afirmações de Kaneko (1989) e nas conclusões de Balarin (1990). O valor médio de Glob (Quadro 3), ainda que acima dos limites de normalidade registrados por Kaneko (1989), demonstrou forte compatibilidade com a citação de Balarin (1990), sugerindo que os animais estudados não exibissem anormalidades neste particular, guardadas as semelhanças de raça, sexo, idade e condições ambientais e de manejo entre o presente trabalho e o do último autor.

As atividades séricas das enzimas estudadas (Quadro 3) mostraram-se, por fim, igualmente normais para a espécie segundo as indicações de Kaneko (1989) e Blood & Radostits (1989), assim como, algumas referências da literatura nacional (Dayrell et al. 1972, Lopes et al. 1972, Nicoletti et al. 1981), com exceção da consistente elevação observada na atividade da CPK, o que deve refletir a presença de lesões na musculatura esquelética secundárias à compressão e isquemia pelo decúbito permanente, condição clínica prevalente em todas as vacas estudadas. A grande variabilidade quanto à intensidade da alteração sérica deve-se provavelmente ao fato de que nem todos os animais apresentavam-se em decúbito por um período suficientemente prolongado, determinando assim variações no grau e extensão da lesão muscular.

Macroelementos minerais no tecido ósseo

As concentrações de cinzas obtidas (Quadro 4) encontraram-se ligeiramente inferiores às referidas por Ammerman et al. (1974) como normais para a espécie, sendo semelhantes às citadas por Sousa et al. (1986) e superiores, contudo, àquelas observadas por Lopes et al. (1980a) e Pott et al. (1987) em bovinos deficientes em Ca e/ou P, indicando na porção mineralizada do tecido ósseo, o as colocações destes autores, pode estar as não balanceadas no que se refere à relação Ca:P. Este achado, ainda que de menor magnitude, concorda com o relato de Real et al. (1991) nas vacas acometidas pelo problema em estudo.

Com relação aos valores de Ca (Quadro 4), observou-se uma oscilação dentro dos limites considerados aceitáveis para bovinos sadios (Ammerman et al. 1974), apresentando-se superiores aos obtidos pelos demais autores consultados (Sousa et al. 1979, 1986, Lopes et al. 1980a, Pott et al. 1987), o que, com base nas discussões destes trabalhos, vai contra a possibilidade de deficiência do elemento nos animais estudados, contradizendo, portanto, as suspeitas de Real (1989) e Real et al. (1991).

O oposto pode ser verificado para P já que os níveis encontrados (Quadro 4) estiveram, de forma similar ao teor de cinzas, discretamente abaixo, ainda que próximos, dos limites inferiores de normalidade sugeridos por Ammerman et al. (1974), mostrando-se, no entanto, superiores aos registrados nos demais levantamentos nacionais (Sousa et al. 1979, 1986, Lopes et al. 1980a, Pott et al. 1987), permitindo a interpretação de que tais autores tenham possivelmente se defrontado com um grau de deficiência, apesar de marginal, mais acentuado do que o observado nos animais estudados. Merece, por sua vez, destaque o fato do referido achado ser fortemente coerente com a hipofosfatemia e com a redução do teor de cinza óssea, anteriormente consideradas, alterações estas que caracterizam em conjunto o estado carencial de P (Underwood 1983, Blood & Radostits 1989) e se assemelham aos relatos de Lopes et al. (1980a) e Sousa et al. (1986) indicando a ampla distribuição geográfica deste tipo de deficiência no Brasil, o que está de acordo com as revisões de Tokarnia et al. (1973, 1988).

No que toca finalmente aos níveis de Mg (Quadro 4), não se observaram alterações sugestivas de desequilíbrio, apresentando-se semelhantes aos verificados por Sousa et al. (1982) e mais elevados do que os obtidos por Sousa et al. (1987) e Pott et al. (1987).

Microelementos minerais no tecido hepático

Os resultados obtidos para Cu (Quadro 5) foram superiores aos valores de referência apontados por Graham (1991) para a espécie, assim como aos teores observados por Correa (1957), Tokarnia et al. (1959, 1960, 1968, 1971) e Fernandes et al. (1976), mostrando-se próximos aos referidos por Lopes et al. (1980b) e Sousa et al. (1980, 1989), e inferiores somente aos verificados por Brum et al. (1987).

Quanto a Zn (Quadro 5), os valores estiveram acima daqueles considerados por Graham (1991) como sugestivos de deficiência, apresentando igual comportamento quando comparados aos resultados de Sousa et al. (1982) e Sousa & Darsie (1985), e assemelhando-se aos achados de Lopes et al. (1980b) e Brum et al. (1987).

À semelhança das demais observações na literatura nacional (Sousa et al. 1981, Sousa & Darsie 1986, Brum et al. 1987), os valores de Fe e Mn (Quadro 5) mostraram-se, mais uma vez, superiores aos apontados por Graham (1991) como críticos para bovinos.

Quadro 4. Apresentação dos resultados de cinzas, cálcio (Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg) no tecido ósseo das vacas de corte (n=26) naturalmente acometidas pelo botulismo; Estado de São Paulo

	Cinzas (%)	Ca (%)	P (%)	Mg (%)
x	60,35	39,50	17,26	0,50
s	1,90	1,27	0,42	0,06
CV	3,15	3,22	2,46	12,06
IC LI	59,59	38,99	17,09	0,47
LS	61,11	40,01	17,43	0,52
Md	60,87	39,41	17,18	0,50

Quadro 5. Estatística descritiva para as variáveis cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn) e cobalto (Co) observadas no tecido hepático de vacas de corte (n=28) naturalmente acometidas pelo botulismo; Estado de São Paulo

	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Co (ppm)
x	229,21	150,30	395,08	10,66	0,226
s	114,45	33,80	126,10	2,59	0,039
CV	49,93	22,48	31,91	24,34	17,642
IC LI	185,08	137,26	346,46	9,66	0,210
LS	273,34	163,33	443,70	11,66	0,241
Md	188,30	149,20	354,60	10,20	0,233

No que se refere, enfim, a Co (Quadro 5), seus resultados apresentaram-se dentro da faixa de variação normal sugerida por Graham (1991), estando acima dos encontrados por Correa (1957), Tokarnia et al. (1961, 1968, 1971) e Fernandes et al. (1976) em bovinos deficientes, e abaixo dos verificados por Sousa et al. (1981) e Sousa & Darsie (1985).

Conforme o assumido por Tokarnia et al. (1973, 1988), Underwood (1983) e Graham (1991), baseando-se no destacado valor diagnóstico destas determinações, a interpretação dos resultados supracitados sugere que as vacas estudadas não apresentavam deficiências relacionadas aos microelementos minerais investigados.

Merece consideração final o fato de que a análise do conjunto de resultados laboratoriais é compatível com o diagnóstico de botulismo, uma vez que nesta enfermidade não são esperadas alterações hematológicas, líquóricas ou bioquímicas (Blood & Radostits 1989). A coerência foi mais uma vez estabelecida quando alguns resultados mostraram-se indicativos de deficiência de P nas vacas acometidas, pois esta é uma condição classicamente associada com a ocorrência do botulismo epizootico em bovinos (Tokarnia et al. 1970a,b, 1988), indicando a existência de tal relação direta na região de abrangência do estudo.

CONCLUSÕES

Nas condições em que se desenvolveu o presente trabalho, os resultados permitiram as conclusões a seguir:

1. As alterações hematológicas caracterizaram-se por leucocitose com neutrofilia sem modificações quanto ao eritrograma ou níveis de proteínas plasmáticas totais e fibrinogênio;

2. O líquido cefalorraquidiano apresentou-se normal nos seus aspectos físico e bioquímico, com ligeira elevação na celularidade em razão da presença de eritrócitos;

3. O estudo bioquímico sérico não revelou anormalidades para os valores de Mg, Na, K, Cl, PT, Glob e atividades de FA, AST e GGT, apontando a presença de hipocalcemia, hipofosfatemia como indicativo da deficiência de P, hypoalbuminemia como sugestivo de deficiência protéica, e elevação na atividade da CPK caracterizando a lesão muscular consequente ao decúbito;

4. As dosagens no tecido ósseo mostraram concentrações normais de Ca e Mg, e níveis discretamente reduzi-

dos de cinzas e P, reforçando as evidências de que os animais acometidos encontravam-se em estado carencial de P;

5. Os teores hepáticos de Cu, Zn, Fe, Mn e Co apresentaram-se dentro dos limites de normalidade, contradizendo a hipótese de desequilíbrios dietéticos relacionados a estes nutrientes;

6. A ausência de apreciáveis alterações na maioria das variáveis investigadas, assim como os resultados indicativos da deficiência de P, encontram coerência com o diagnóstico de intoxicação botulínica nos animais estudados.

REFERÊNCIAS

- Almeida C.T. 1985. Valores de pH, PO₂, PCO₂, HCO₃ e níveis de sódio, potássio e cloretos no sangue de bovinos das raças Gir e Guzerá. Tese de Doutorado, Fac. Med. Vet. Zootec., Unesp, Botucatu. 70p.
- Almeida C.T., Couto E.S. & Kohayagawa A. 1980. Valores de sódio, potássio e cloretos no sangue de bovinos da raça Nelore. Arq. Esc. Vet. UFMG 32(1):19-24.
- Ammerman C.B., Loaiza J.M., Blue W.G., Gamble J.F. & Martin G.F. 1974. Mineral composition of tissues from beef cattle under grazing conditions in Panama. J. Anim. Sci. 38(1):158-162.
- Balarin M.R.S. 1990. Avaliação do estado nutricional de cálcio e fósforo em bovinos por meio da análise bioquímica da urina. Tese de Mestrado, Fac. Med. Vet. Zootec., Unesp, Botucatu. 34p.
- Berquó E.S., Souza J.P.M. & Gotlieb L.D. 1980. Bioestatística. EPU, São Paulo. 325p.
- Blood D.C. & Radostits O.M. 1989. Veterinary Medicine. 7th ed. Baillière Tindall, London. 1502p.
- Brum P.A.R., Sousa J.C., Comastri Filho J.A. & Almeida I.L. 1987. Deficiências minerais de bovinos na sub-região dos Paiaguás, no Pantanal Mato-Grossense. II. Cobre, zinco, manganês e ferro. Pesq. Agropec. Bras. 22(9/10):1049-1060.
- Coles E.H. 1986. Veterinary Clinical Pathology. 4th ed. W.B. Saunders, Philadelphia. 486p.
- Correa R. 1957. Carência de cobalto em bovinos. I. Estudo clínico e demonstração experimental da existência da doença no Brasil. Arqs Inst. Biológico., S. Paulo, 24:199-227.
- Dayrell M.S., Lopes H.O.S., Aroeira J.A.D.C., Ferreira Neto J.M. & Sampaio I.B.M. 1972. Teores de cálcio, magnésio, fósforo inorgânico e atividade da fosfatase alcalina no soro sanguíneo de bovinos criados no cerrado. Arq. Esc. Vet. UFMG 24(3):265-274.
- Döbereiner J., Langenegger J., Tokarnia C.H. & Dutra I.S. 1990. Botulismo epizootico dos bovinos no Brasil. Anais 16º Congr. Mundial de Buiatria, Salvador, p. 540-546.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H., Langenegger J. & Dutra I.S. 1992. Epizootic botulism of cattle in Brazil. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 99:188-190.
- Dutra I.S., Weiss H.E., Weiss H. & Döbereiner J. 1993. Diagnóstico do botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfiação de complemento. Pesq. Vet. Bras. 13:83-86.
- Fagliari J.J., Okuda H.T., Passipieri M. & Curi P.R. 1991. Valores de referência das proteínas séricas de bovinos Guzerá em diferentes faixas etárias. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 43(1):39-60.
- Fernandes N.S., Santiago A.M.H., Camargo W.V.A. & Vianna S.S.S. 1976. Níveis estacionais de cobre e de cobalto em tecido animal e vegetal. Atualidades Veterinárias, S. Paulo, 5(28):24-27.
- Fichtner S.S., Jardim E.C. & Costa C.P. 1976. Contribuição ao estudo das carências minerais em bovinos no Estado de Goiás (determinação dos níveis séricos de cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio). Anais Esc. Agr. Vet. UFG. 1:154-156.

- Fick K.R., McDowell L.R., Miles P.H., Wilkinson N.S., Funk J.D. & Conrad J.H. 1979. Methods of mineral analysis for plant and animal tissues. 2nd ed. Animal Science Department, University of Florida, Gainesville. 84p.
- Graham T.W. 1990. Trace element deficiencies in cattle. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 7(1):153-215.
- Jain N.C. 1986. Schalm's Veterinary Hematology. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 1220p.
- Kaneko J.J. 1989. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 4th ed. Academic Press, San Diego. 932p.
- Kohayagawa A., Lisbôa J.A.N., Mogami S.R.K. & Curi P.R. 1993. Influência do sexo e da faixa etária nos níveis séricos de cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio em bovinos da raça Nelore. Vet. Zootec, Botucatu, 5:113-120.
- Lopes H.O.S., Ferreira Neto J.M. & Veloso J.A.F. 1972. Estudo dos teores de cálcio, fósforo, magnésio e atividade da fosfatase alcalina em bovinos criados no cerrado. Arq. Esc. Vet. UFMG. 24(1):33-43.
- Lopes H.O.S., Fichtner S.S., Jardim E.C., Costa C.P. & Martins Junior W. 1980a. Composição mineral de amostras de solo, forragem e tecido animal da micro-região Mato Grosso de Goiás. I. Cálcio, fósforo, magnésio e potássio. Arq. Esc. Vet. UFMG 32(2):161-174.
- Lopes H.O.S., Fichtner S.S., Jardim E.C., Costa C.P. & Martins Junior W. 1980b. Teores de cobre e zinco em amostras de solo, forrageiras e tecido animal da micro-região Mato Grosso de Goiás. Arq. Esc. Vet. UFMG 32(2):151-159.
- Mayhew I.G. 1989. Large Animal Neurology. Lea & Febiger, Philadelphia. 380p.
- Nicoletti J.L.M., Kohayagawa A., Gandolfi W., Iamaguti P. & Quintanilha A.M.N.P. 1981. Alguns teores de constituintes séricos e hemograma em vacas das raças Gir, Holandês Preto e Branco e mestiças (Girolandia), na região de Botucatu, SP. Arq. Esc. Vet. UFMG 33(1):19-30.
- Pott E.B., Brum P.A.R., Almeida I.L., Comastri Filho J.A. & Dynia J.F. 1987. Nutrição mineral de bovinos de corte no Pantanal Mato-Grossense. I. Levantamento de macronutrientes na Nhecolândia (parte central). Pesq. Agropec. Bras. 22(9/10):1093-1109.
- Real C.M. 1989. Etiologia da mortandade de vacas em Mato Grosso do Sul, Brasil: nota prévia. Hora Vet., Porto Alegre, 51:16-18.
- Real C.M., Real M.R. & Real M.R. 1991. Etiologia da mortandade de vacas em Mato Grosso do Sul, Brasil. Hora Vet., Porto Alegre, 63:39-53.
- Sousa J.C., Conrad J.H., Blue W.G. & McDowell L.R. 1979. Interrelações entre minerais no solo, plantas forrageiras e tecido animal. I. Cálcio e fósforo. Pesq. Agropec. Bras. 14(4):387-395.
- Sousa J.C., Conrad J.H., Blue W.G., Ammerman C.B. & McDowell L.R. 1981. Interrelações entre minerais no solo, plantas forrageiras e tecido animal. 3. Manganês, ferro e cobalto. Pesq. Agropec. Bras. 16(5):739-746.
- Sousa J.C., Conrad J.H., McDowell L.R., Ammerman C.B. & Blue W.G. 1980. Interrelações entre minerais no solo, plantas forrageiras e tecido animal. 2. Cobre e molibdênio. Pesq. Agropec. Bras. 15(3):335-341.
- Sousa J.C., Conrad J.H., Mott G.O., McDowell L.R., Ammerman C.B. & Blue W.G. 1982. Interrelações entre minerais no solo, plantas forrageiras e tecido animal no norte de Mato Grosso. 4. Zinco, magnésio, sódio e potássio. Pesq. Agropec. Bras. 17(1):11-20.
- Sousa J.C. & Darsie G. 1985. Deficiências minerais em bovinos de Roraima, Brasil. I. Zinco e cobalto. Pesq. Agropec. Bras. 20(11):1309-1316.
- Sousa J.C. & Darsie G. 1986. Deficiências minerais em bovinos de Roraima, Brasil. II. Ferro e manganês. Pesq. Agropec. Bras. 21(7):763-769.
- Sousa J.C., Gonçalves E.M., Viana J.A.C. & Darsie G. 1986. Deficiências minerais em bovinos de Roraima, Brasil. III. Cálcio e fósforo. Pesq. Agropec. Bras. 21(12):1327-1336.
- Sousa J.C., Gonçalves E.M., Viana J.A.C. & Darsie G. 1987. Deficiências minerais em bovinos de Roraima, Brasil. IV. Magnésio, sódio e potássio. Pesq. Agropec. Bras. 22(1):89-98.
- Sousa J.C., Nicodemo M.L.F. & Darsie G. 1989. Deficiências minerais em bovinos de Roraima, Brasil. V. Cobre e molibdênio. Pesq. Agropec. Bras. 24(12):1547-1554.
- Tokarnia C.H., Mitidieri E. & Affonso O.R. 1959. Dados analíticos sobre valores de cobre e ferro encontrados em fígados de bovinos e ovinos do Nordeste e Norte do Brasil. Arqs Inst. Biol. Animal, Rio de J., 2:33-37.
- Tokarnia C.H., Canella C.F.C. & Döbereiner J. 1960. Deficiência de cobre em bovinos do delta do Rio Parnaíba, nos Estados do Piauí e Maranhão. Arqs Inst. Biol. Animal, Rio de J., 3:25-37.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J., Canella C.F.C. & Dâmaso M.N.R. 1961. Deficiência de cobalto em bovinos na Serra da Ibiapaba, no Estado do Ceará. Arqs Inst. Biol. Animal, Rio de J., 4:195-202.
- Tokarnia C.H., Canella C.F.C., Guimarães J.A. & Döbereiner J. 1968. Deficiências de cobre e cobalto em bovinos e ovinos no Nordeste e Norte do Brasil. Pesq. Agropec. Bras. 3:351-360.
- Tokarnia C.H., Canella C.F.C., Guimarães J.A., Döbereiner J. & Langenegger J. 1970a. Deficiência de fósforo em bovinos no Piauí. Pesq. Agropec. Bras. 5:483-494.
- Tokarnia C.H., Langenegger J., Langenegger C.H. & Carvalho E.V. 1970b. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. Pesq. Agropec. Bras. 5:465-472.
- Tokarnia C.H., Guimarães J.A., Canella C.F.C. & Döbereiner J. 1971. Deficiências de cobre e cobalto em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. Pesq. Agropec. Bras. 6:61-77.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1973. Diseases caused by mineral deficiencies in cattle raised under range conditions in Brazil, a review. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Vet. 8(Supl.):1-6.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Moraes S.S. 1988. Situação atual e perspectivas da investigação sobre nutrição mineral em bovinos no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 8(1/2):1-16.
- Underwood E.J. 1983. Los Minerales en la Nutrición del Ganado. 2ª ed. Acribia, Zaragoza. 210p.
- Weiss H.E. & Weiss H. 1988. Nachweis von *Clostridium botulinum*-Toxin mittels Mikro-Wärmelementbindungsreaktion. Tierärztl. Umschau 43:117-126.